ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 — N° 87

Méthodes de dosage de la bilirubinemie application à sa mesure chez le cheval sain

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

LESCROART Pascal, Valmyre, Christian

Né le 20 Juin 1947 à Caudry (Nord)

Jury :

Président M. GADRAT, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs M. FLORIO, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. RICO, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

TOULOUSE
IMPRIMERIE DU VIGUIER
6, rue Ninau, 6

1972

Méthodes de dosage de la bilirubinemie application à sa mesure chez le cheval sain

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 — N° 87

Méthodes de dosage de la bilirubinemie application à sa mesure chez le cheval sain

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

LESCROART Pascal, Valmyre, Christian

Né le 20 Juin 1947 à Caudry (Nord)

Jury :

Président M. GADRAT, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs M. FLORIO, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. RICO, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

IMPRIMERIE DU VIGUIER
6, RUE NINAU – TOULOUSE

1972

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

DIRECTEUR. . . . . MM. FLORIO
DIRECTEURS HONORAIRES. . . . . PONS, DARRASPEN
PROFESSEUR HONORAIRE. . . . . LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie.
Professeur titulaire. . . . . M. **Godfrain**
Maître-Assistant. . . . . Mme **Burgat-Sacaze**
Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales.
Professeur titulaire. . . . . M. **Rico**
Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux domestiques.
Professeur titulaire. . . . . M. **Pavaux**
Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique.
Professeur titulaire. . . . . MM. **Ruckebusch**
Maître de Conférences, non Chef de Service. . . . . **Fargeas**
Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique.
Professeur titulaire. . . . . MM. **Van Haverbeke**
Professeur sans Chaire. . . . . **Cabanié**
Maître-Assistant. . . . . **Magnol**
Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale.
Professeur titulaire. . . . . M. **Labie**
Maître-Assistant. . . . . **Eeckhoutte**
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des Denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parisitaires.
Professeur titulaire. . . . . M. **Brizard**
Maître-Assistant Agrégé. . . . . **Dorchies**
Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de Séméiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores.
Professeur titulaire. . . . . M. **Florio**
Professeur sans Chaire. . . . . **Lescure**
Maître-Assistant. . . . . **Guelfi**
Séméiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie - Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et Animaux de basse-cour.
Professeur titulaire. . . . . M. **Tournut**
Professeur sans Chaire. . . . . **Espinasse**
Maître-Assistant. . . . . **Bézille**
Séméiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour - Clinique
Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale.
Professeur titulaire. . . . . M. **Cazieux**
Propédeutique et Séméiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgical

Chaire de Pathologie de la Reproduction.
Professeur titulaire. . . . . M. **Berthelon**
Professeur sans Chaire. . . . . **Royal**
Maître-Assistant. . . . . **Tainturier**
Séméiologie et Propédeutique
Pathologie de la Reproduction - Obtétrique - Clini

Chaire de Maladies Contagieuses - Zoonoses Législation Sanitaire.
Professeur titulaire. . . . . M. **Saurat**
Maître-Assistant Agrégé. . . . . **Chantal**
Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

Chaire de Pathologie générale - Microbiologie Immunologie.
Professeur titulaire. . . . . M. **Lautié**
Maître-Assistant. . . . . **Meignier**
Microbiologie - Immunologie - Pathologie généra

Chaire de Zootechnie et Economie Rurale.
Professeur titulaire. . . . . M. **Queinnec**
Maître-Assistant. . . . . **Darre**
Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène géné
Zootechnie - Elevage
Economie générale et des Productions animale

Chaire d'Alimentation.
Professeur titulaire. . . . . M. **Faliu**
Maître de Conférences, non **non chef deservice,** **Griess**
Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES — CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies Infectieuses. . . . . MM. **Monnier**
Aspect médical des Zoonoses. . . . . **Armengaud**
Energétique. . . . . **Labouche**
Initiation à l'Informatique Biomédicale. . . . . **Fernet**
Agronomie. . . . . **Combret**
Métabolismes. . . . . **Raynaud**

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats
(Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924)

UNIV. LEIDEN BIBL.

A MES PARENTS

A MES FRERES ET SŒURS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GADRAT

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Chevalier de la Légion d'honneur,

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR FLORIO

Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR RICO

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous ont fait l'honneur de participer à notre Jury de Thèse.

A MONSIEUR LE MAITRE-ASSISTANT GUELFI

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

En remerciement de l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail ; qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

INTRODUCTION

La connaissance des fractions sanguines de bilirubine libre et de bilirubine glycurono-conjuguée a une grande importance en pathologie vétérinaire dans l'étude des ictères.

Il nous a paru intéressant de décrire les nombreuses méthodes de détermination de la bilirubinémie, en dégageant leurs avantages et leurs inconvénients.

Nous réaliserons ensuite le dosage des diverses fractions de bilirubine plasmatique chez le cheval, dont le sang contient à l'état normal une quantité non négligeable de bilirubine glycurono-conjuguée, les méthodes choisies étant celle de JENDRASSIK, couramment employée dans les laboratoires vétérinaires, et celle d'EBERLIN, qui permet le dosage des fractions mono- et diglycuronides de la bilirubine.

I - METHODES UTILISEES POUR LA SEPARATION ET LA DETERMINATION DES PIGMENTS BILIAIRES

Les pigments de la bile sont des composés tétrapyrroliques à chaîne ouverte formés par la dégradation des complexes fer-porphyrine. Ces pigments se trouvent dans le sang et dans certains tissus puis sont excrétés dans la bile et l'urine.

Le pigment biliaire le plus important est la bilirubine. Dans le plasma, elle se trouve liée à l'albumine (12-13-14) par l'intermédiaire de sites au nombre de deux (117-94 (4-5). Dans le foie, la bilirubine est conjuguée à l'acide glycuronique (14-134-142) et à d'autres substances (135-67). Dans la bile, la majeure partie des pigments est présente sous forme de diglycuronide. Chacune des deux molécules d'acide glycuronique se fixe sur chacun des deux acides propioniques de la bilirubine (129).

L'existence d'une bilirubine monoglycuronique fut longtemps discutée. Il apparaît aujourd'hui qu'il existe un pigment consistant en parties équimolaires de bilirubine et d'acide glycuronique, trouvé dans le plasma sanguin lors de certains états ictériques. Celui-ci est un complexe de bilirubine libre et de bilirubine diglycuronique (156).
In vitro, la formation d'un tel complexe a été démontrée par les observations spectrophotométriques de Jacobsen (27). La bilirubine diglycuronide est liée à l'albumine dans le plasma et aux phospholipides dans la bile, ainsi qu'au cholestérol et probalement aux protéines, comme le montrent les expérimentations de Nakayama et Miyaka (112), de Bouchier et Cooperband (22), de Verschure et Mejnlieff (152).

Il existe d'autres conjugués de la bilirubine dans la bile mais ils sont beaucoup moins bien connus. Isselbacher et ses collaborateurs (81) ont découvert du sulfate de bilirubine dans la bile du rat. Plusieurs chercheurs en ont cherché l'existence possible dans la bile humaine (157).
Varela-Fuentes et Viana en 1935 découvrirent un complexe de bilirubine et de lécithine (150). Leurs études furent reprises plusieurs fois ensuite (11-78).

Baumgartel (10) mit en évidence dans la bile humaine un conjugué de la bilirubine qu'il appela mésobilirubine.
De nombreuses méthodes pour la séparation et la détermination quantitative des divers composés de la bilirubine furent et sont encore l'objet de recherches. Nous décrirons

ci-après diverses méthodes sélectionnées ou mises au point par divers auteurs. Nous ne traiterons pas de la détermination d'autres pigments de la bile, tels la biliverdine, les mobilines, la glaucobiline.

A. PRINCIPES.

I. — Séparation par chromatographie.

1. *Chromatographie en phase inversée.*

Peu de méthodes de chromatographie de la bilirubine furent dévelopées, et aucune de celles-ci ne s'est révélée entièrement satisfaisante, par suite de l'instabilité des produits et de leur absorption délicate dans les colonnes de chromatographie.

La plus ancienne méthode fut celle de chromatographie en phase inversée développée par Cole, Billing et Lathe (14-15-16-42). La colonne, en kieselguhr traité aux silicones selon Howard et Martin, est préparée de la façon suivante : le kieselguhr purifié (Hyflo Supercell British Drug House) est séché à 110°, refroidi et enduit de silanes en passant dans un dessicateur à diméthyl-dichloro-silane ou par passage d'un jet d'air à travers le silane puis à travers le kieselguhr, jusqu'à ce que le produit flotte totalement sur l'eau. Il est ensuite lavé avec du méthanol jusqu'à ce que les produits de lavage ne virent plus le bleu de bromothymol, puis il est séché à 110°.

La phase stationnaire est faite de kieselguhr traité aux silicones, saturé avec la phase supérieure d'un mélange à volumes égaux de N-butanol et d'un tampon phosphate (5 M/l, pH = 6,0) (77). Elle est préparée de la façon suivante : 1,5 g de kieselguhr traité aux silanes et 0,75 g de la solution de butanol sont activés par addition de 10 ml de la phase aqueuse mentionnée ci-dessus. La solution trouble formée est versée dans la colonne et est laissée à reposer.

La solution (sérum sanguin) est mélangée à une solution saturée de sulfate d'ammonium et d'éthanol dans les proportions suivantes : 1 ml de sérum pour 0,18 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium et 2,5 ml d'éthanol. On laisse le mélange dans l'obscurité pendant 30 minutes.

Le surnageant est évaporé par le vide à la température du Laboratoire jusqu'à formation d'une poudre qu'on dissout dans 0,5 ml au maximum du tampon phosphate saturé de butanol.

On peut trouver chaque pigment insoluble sur la colonne par adjonction de 1 ml d'éthanol sur une petite quantité de la phase stationnaire juste avant séchange.

Après chromatographie et séparation mécanique des zones, les trois fractions sont converties en azopigments et éludées par de l'acide diazo-benzène-sulfonique dans l'éthanol.

L'élution quantitative des pigments biliaires n'a pas été réalisée.

La chromatographie des pigments de la bile et du plasma de sang d'individu ictérique nous donne trois parties colorées en jaune : la bilirubine libre reste au sommet de la colonne, tandis que les conjugués sont séparés en deux parties : le pigment II, plus polaire, est déplacé par le solvant plus loin que le pigment I. Le pigment II contient de la bilirubine diglycuronide à côté d'autres conjugués. Le pigment I correspond à de la bilirubine monoglycuronide ou à un complexe de bilirubine libre et de bilirubine diglycuronide (68). Une nouvelle chromatographie des pigments I et II nous donne encore les trois zones.

Cette méthode a été utilisée par Billing (15) et Baikye (5) pour la détermination de ces trois parties à partir de sérums d'enfants ictériques.

Schoenfield, Foulk et Bollman (136) ont comparé les résultats de cette chromatographie avec ceux obtenus par division des phases d'Eberlein (49), par diazotation de Malloy et Evelyn et par méthode de Schachter (130). [Voir chapitre II, paragraphe 2].

Ils ont trouvé une corrélation dans les résultats, mais la nature chimique des diverses parties n'est pas encore bien précisée.

La détermination spécifique de la bilirubine non conjuguée (ou bilirubine libre) par la méthode d'extraction par le chloroforme et de la bilirubine diglycuronide par dérivation des isotopes donne, dans des conditions cliniques variées,

des résultats très différents de ceux de la chromatographie en phase inversée (148).

En modifiant légèrement la méthode décrite ci-dessus, et en utilisant la spectrophotométrie pour réaliser ensuite le dosage quantitatif de la bilirubine libre, KUENZLE, SOMMERHALDER, RÜTTNER et MAIER (90-91-92) ont séparé et mesuré les taux de 4 fractions de bilirubine dans le sérum sanguin et de 3 fractions dans la bile (1-64-131) (138-139-158).

Selon BILLING, la méthode décrite fournit des résultats intéressants pour le diagnostic des ictères par rétention ou par hépatite. Cependant, cet auteur nous signale les points suivants : l'extraction des pigments du sérum est incomplète, et la chromatographie sur colonne en phase inversée n'intéresse que 85 à 90 % de la bilirubinémie; il est impossible d'analyser les sérums dont la teneur en pigments biliaires est inférieure à 50 mg/litre. La chromatographie, de plus, ne peut s'utiliser lorsque les constituants lipidiques du sang sont en quantité importante.

On peut donc dire, d'après les travaux de BILLING, que cette méthode en apparence très séduisante perd un peu de son intérêt puisqu'elle ne peut s'appliquer à tous les sérums hyperbilirubinèmiques.

2. *Chromatographie par échange d'ions* (89).

La bilirubine est assez stable à basse température dans un solvant composé d'une solution aqueuse d'ammoniaque, d'éthanol et de chloroforme (respectivement 18, 70, 50).

La chromatographie par échange d'ions est possible avec le diethyl-amino-éthyl dextran (DEAE, Sephadex A-25) comme phase stationnaire. Le Sephadex est saturé par de l'eau pendant une heure puis lavé par une solution de soude 0,5 N dont les ions OH^- prennent la place des ions chlorures du Sephadex commercial; quand il n'y a plus de chlorure de sodium dans l'effluent, on lave à l'eau distillée pour enlever les traces de soude restante.

La substance humide est laissée 30 minutes dans une solution d'éthanol à 96 %. L'éthanol est ensuite enlevé par aspiration à travers un filtre et le produit est utilisé pour garnir la colonne. On introduit ensuite la solution de pigments biliaires au sommet de la colonne, cette solution étant

formée de 18 parties d'ammoniac pour 70 parties d'éthanol et 50 parties de chloroforme, dans laquelle on met le sérum sanguin ou l'échantillon de bile. Après centrifugation, on réalise l'élution qui ne commence qu'avec une solution d'acide chlorhydrique 2 N et qui augmente jusqu'avec une solution 30 N.

Par cette technique, bilirubine et mésobilirubine peuvent être séparées complètement. Les conjugués de bilirubine provenant de la bile sont partiellement hydrolysés et transformés en autres substances, peut-être des amides, donnant naissance à 5 couches bien séparées.

3. *Filtration par gel des conjugués de la bilirubine.*

Les conjugués de la bilirubine peuvent être séparés par le dextran alkylé (Sephadex LH-20) à l'aide d'une solution à volumes égaux d'éthanol et d'eau (27).

On obtient à partir de la bile humaine 4 fractions, l'une se déplaçant rapidement, complètement séparée de 3 autres fractions partiellement séparées. De ces trois fractions, c'est la bilirubine diglycuronide qui se déplace la plus rapidement et qui est en quantité la plus importante.

4. *Chromatographie sur papier.*

Plusieurs chercheurs ont dévoloppé des méthodes de chromatographie sur papier des pigments biliaires (96-99-100-127-128-81). Sato et Saitoh (47) utilisèrent le filtre de Toyo en papier n° 2 ou n° 51 et l'un des trois solvants suivants : chloroforme, solution aqueuse de propanol à 50 %, solution d'un volume d'eau, d'un volume de n-butanol et d'un volume d'éthonal. Ces auteurs ont obtenu des chromatographies bien définies avec le dernier solvant mentionné sur papier Whatman n° 1 ou n° 3.

Noir, Garay et Roger (113) ont inventé une technique bidimensionnelle sur papier Whatman n° 3 utilisant une solution aqueuse de n-butanol et d'éthanol (respectivement 6 et 2 parties pour 3 parties d'eau) pour la première dimension.

Après hydrolyse par l'ammoniac pendant 24 heures et déplacement de l'excès d'ammoniac par un jet d'air, on réalise une seconde chromatographie à l'aide du mélange n-

butanol-acide acétique-eau (12/3/5).

Les traces d'acide glycuronique sont mises en évidence sur le papier par un réactif constitué de 5 volumes d'acétone à 0,2 % de naphtorésorcinol et d'un volume de solution à 9 % d'acide phosphorique. Les taches d'acide glycuronique apparaissent alors en bleu.

Les auteurs identifièrent la biliverdine, la bilirubine diglycuronide, la biliverdine monoglycuronide, la bilirubine libre et la bilirubine monoglycuronide.

Clarke utilisa comme solvant l'isopropanol (41) et une solution aqueuse de carbonate monosodique (8,4 g/litre) dans les proportions de 7 parties d'isopropanol pour 3 de solution aqueuse. Ce dernier système fut également utilisé par d'autres chercheurs, tels que Talafant et Appelt (143).

5. *Chromatographie sur couche mince des azo-dérivés* (123-100).

Les azo-pigments, obtenus par réaction entre les pigments de la bile et l'acide sulfanilique diazoté, sont plus stables que leurs pigments respectifs et conviennent mieux à la séparation chromatographique. Le solvant le plus largement utilisé, mis au point par Schmid (132) est une solution aqueuse de méthyl-éthyl-cétone et d'acide propionique (respectivement 15 et 5 parties pour 6 parties d'eau).

A l'origine, on utilisait ce solvant avec du papier; on obtient aujourd'hui une séparation plus rapide et plus nette sur des plaques à couche mince de gel de silice, comme le suggère Tenhunen (146).

Après action du diazo-réactif, comme il est décrit au paragraphe 2 du chapitre, les azo-pigments sont extraits par une petite quantité de n-butanol et déposés sur la plaque.

Les traces sont très bien définies et on trouve comme principaux composants l'azo-pigment A non conjugué et l'azo-pigment B, composé glycuronique qui tire son origine de l'accouplement de la bilirurine libre et de la bilirubine diglycuronide (43).

Pour l'élution, on utilise une solution aqueuse de méthanol à 50 % mais on ne peut obtenir de rapports quantitatifs.

Citons pour mémoire les travaux équivalents de Gaidano,

Pagliardi et Favero (62), ceux de Harbison, Boerth et Spratt (71) qui utilisèrent la chromatographie sur colonne, ceux de Petryka (123) qui dosa par densitomètrie directe les pigments biliaires fractionnés par chromatographie sur plaque à gel de silice ou à polyamide et qui calcula les courbes d'étalonnage pour la mésobilirubine, la mésobiliverdine, la stercobiline et les esters diméthyliques de la stercobiline et de la biliverdine.

II. — Séparation par solvants non miscibles.

1. *Bilirubine, mésobilirubine et conjugués.*

La bilirubine est peu soluble dans l'eau (119) et dans les solvants non polaires, mais est très soluble par contre dans le chloroforme et les autres solvants polaires tels que la formamide et le diméthylsulfoxyde.

Les différences mineures de structure chimique causent des changements importants de solubilité. La division des pigments de la bile par deux phases macroscopiques de solvants est une méthode valable de séparation de ces substances.

En 1923, Grünenberg (69) utilisa l'extraction par le chloroforme pour la détermination quantitative de la bilirubine et remarqua que certains pigments de la bile, aujourd'hui reconnus comme des conjugués de la bilirubine, restaient dans la phase aqueuse.

Plusieurs méthodes pour la séparation et la détermination des pigments biliaires ont été mises au point en utilisant le chloroforme (28-121-140), des mélanges de chloroforme et d'acétate d'éthyl (51-159), du méthanol (65), de la méthyl isobutyl-cétone (65), de l'acétate d'éthyl (49-63) et du butanol (49).

Ibott et O'Brien (79) ont remis à l'honneur certaines de ces méthodes.

L'extraction par le chloroforme de la bilirubine libre à partir de solutions aqueuses contenant de l'albumine dépend de la libération du pigment de sa protéine. Les meilleurs résultats sont obtenus à pH : 8,0. A des pH plus élevés ou inférieurs, une plus grande quantité de bilirubine libre reste dans la phase aqueuse (29).

Une extraction plus grande est obtenue ultérieurement par addition de diverses substances telles que le salicylate

de soude qui se lie à l'albumine aux mêmes sites que la bilirubine. Dans le cas de sérum, des lipochromes sont extraits conjointement à la bilirubine. Ces pigments demeurent dans le chloroforme lorsqu'on ajoute un tampon aqueux alcalin qui rejette la bilirubine.

La mésobilirubine accompagne la bilirubine libre lors de ces procédés, tandis que les conjugués de la bilirubine, la biliverdine et plusieurs autres pigments de la bile, non extraits par le choroforme, restent dans la phase aqueuse.

Ces découvertes forment les bases d'une méthode spécifique de détermination de la bilirubine et de la mésobilirubine (28) [Confert paragraphe 6 du chapitre VII].

Certains complexes peu connus de bilirubine et de phospholipides (et peut-être aussi d'autres substances se trouvant dans le sang) ne sont pas extraits par le choloroforme, mais peuvent être retrouvés si on ajoute de l'acétate d'éthyl ou du méthanol au chloroforme et de l'acide lactique ou de l'acide formique à la phase aqueuse.

Tirées de ces principes, diverses méthodes ont été mises au point par Weber et Schalm (158), Ferro et Ham (51), Fog et Bakken (57), Perrelli et Watson (122), Gallo (63). Gladtke (66) mit en évidence une absorption de la couleur sur le précité protéique qui varie avec la concentration en protéines sériques et la concentration en bilirubine. Il en conclut qu'il ne faut pas recommander la méthode de Ferro et Ham.

D'après Howe et Pinto (78), la fraction de bilirubine soluble à l'éther est probablement un complexe bilirubine-phospholipides. On l'extrait du sérum par le diétyléther (150-11-78-151).

2. *Azo-dérivés.*

Les azo-pigments dérivés de la bilirubine et les azo-pigments glycuroniques sont extraits de la solution aqueuse acidifiée par le n-butanol. Ils peuvent être séparés par partage du mélange n-butanol-chloroforme (1 partie de butanol pour 2 de chloroforme) et d'un tampon aqueux de pH égal à 3,0.

Dans ce système, le pigment non conjugué se trouve presque exclusivement dans la phase de solvant organique et le

pigment conjugué se trouve à 90 % dans la phase aqueuse.

A la suite de cette découverte, SCHACHTER (131) réalisa la détermination de faibles concentrations de bilirubine diglycuronide dans les sérums d'hommes sains (30) ; cette méthode est décrite dans le paragraphe 8 du chapitre B II.

III. — Spectrophotométrie.

1. *Bilirubine, mésobilirubine et conjugués.*

La couleur des pigments biliaires a attiré l'attention des chercheurs depuis fort longtemps et offre des moyens pratiques pour leur détermination quantitative.

Si une solution contient un mélange de plusieurs substances colorées, toutes avec un spectre d'absorption différent, il est théoriquement possible de déterminer la concentration de tous les composants en mesurant l'extinction à un nombre donné de différentes longueurs d'onde connues.

Si, cependant, les spectres montrent seulement des différences mineures, telles que celles des spectres de la bilirubine, de la mésobilirubine et de leurs conjugués, des erreurs considérables peuvent résulter de petites erreurs dans les déterminations photométriques.

De plus, la présence de petites quantités d'autres substances colorées, qui est ignorée parce que la contribution à l'absorption de la lumière est très réduite, peut provoquer des erreurs majeures dans la détermination des sommes relatives des principaux pigments. Dans de telles circonstances, des changements mineurs des spectres, dus à la dimérisation, à la liaison protéinique, etc..., doivent être également pris en considération.

Dans une solution de chloroforme, la bilirubine libre a une absorption maximum à 454 nm; la mésobilirubine a un spectre similaire avec maximum d'absorption à 425 nm. Ce sont les spectres d'absorption des acides bilirubiniques monomériques purs et ils sont presque identiques aux spectres de ces acides dissous dans la formamide et dans le diméthylsulfoxyde.

Dans toutes ces solutions, le coefficient d'extinction est proportionnel à la concentration.

Les sels de sodium et de potassium de la bilirubine sont solubles dans l'eau. La courbe spectrale de la solution mon-

tre un changement de forme si la concentration augmente par suite de la dimérisation réversible de l'anion de bilirubine (31).

Les changements caractéristiques des spectres se voient lorsque l'anion de bilirubine est lié à l'albumine, cette liaison variant avec la valeur du pH (23-74-103-115-161).

L'anion de bilirubine diglycuronide dans une solution aqueuse montre un spectre qui est différent de celui de l'anion de bilirubine libre, quand bien même le groupement chromophore est identique dans les deux pigments, peut-être par la simple différence des ponts hydrogènes intramoléculaires.

De tels ponts ont été mis en évidence dans une molécule d'acide bilirubinique dans une solution de chloroforme et à l'état solide (58-59-32).

Les mélanges d'anions de bilirubine libre et de bilirubine diglycuronide dans une solution aqueuse montrent des spectres abherrants, indiquant probablement une formation complexe entre ces deux pigments (27).

Tous ces faits et, dans le cas de la détermination dans le sérum sanguin, la présence de liquide trouble, d'hémoglobine, d'oxyhémoglobine, de méthémoglobine, de lipochromes, etc... (2-20-44-60) devraient être pris en considération si la spectrophotométrie directe est utilisée pour la détermination quantitative des pigments de la bile.

Plusieurs méthodes sont utilisées, spécialement pour la détermination de hautes concentrations de bilirubine non conjuguée dans les sérums d'enfants à maladie hémolytique, où il y a relativement peu de substances interférentes.

Les extinctions sont mesurées à une, deux ou trois longueurs d'onde et les corrections sont appliquées pour un ou deux facteurs interférants. Les procédés les plus largement utilisés mesurent la bilirubine non conjuguée, liée à l'albumine, en présence d'oxyhémoglobine, utilisant deux longueurs d'onde (26-40-61-76-83-106-140-159).

La méthode de Fog et Bakken (57), utilisant trois longueurs d'onde, détermine la bilirubine et les conjugués de la bilirubine avec une correction pour l'oxyhémoglobine.

Plusieurs de ces difficultés sont évitées par la méthode

d'Ernst et Förster, modifiée par Mertz et West (107). Mertz et West mélangent un petit volume de sérum à un grand volume d'acétone et mesurent l'extinction du surnageant après déplacement ou précipitation des protéines.

On trouve dans l'acétone tous les lipochromes présents dans le sérum [Voir le paragraphe 3 du chapitre B II].

2. *Azo-dérivés mesurés par spectrophotométrie.*

La réaction (qui utilise l'acide sulfanilique diazoté) sert de base à la plupart des techniques actuelles, plus ou moins commodes ou précises, mais cependant comparables. Ces méthodes, toutes colorimétriques, utilisent une solution étalon de bilirubine, et il convient d'insister sur le fait que les procédés de préparation de cette solution varient considérablement d'une technique à l'autre. Le mode d'étalonnage, très souvent négligé, est la raison essentielle des discordances relevées entre les résultats obtenus sur un même échantillon dans des Laboratoires différents. Bien que le principe soit très simple, on peut obtenir des résultats très différents et quelquefois contraires à toute logique. Ces techniques ont conduit les auteurs à des conditions expérimentales très précises.

Dans la réaction de Van den Bergh, en présence d'acide sulfanilique diazoté, il y a formation d'azopigments rouges. En 1916, Van den Bergh et Müller (149) trouvèrent que les sérums, dans le cas de jaunisse cholestatique, contenaient une bilirubine réagissant rapidement (réaction dite « directe »), tandis que la bilirubine de sérums normaux ou de sérums d'autres formes d'ictères demandait l'addition d'éthanol pour réagir (réaction indirecte). La nature chimique de ces pigments obtenus par réaction directe ou indirecte resta inconnue jusqu'en 1956 lorsque Billing, Cole et Lathe (14), Schmid et Talafant (134-142) découvrirent indépendamment que la bilirubine réagissant directement était conjuguée à l'acide glycuronique.

En 1883, Ehrlich a montré que la bilirubine donnait des diazodérivés colorés spécifiques en présence d'acide sulfanilique diazoté; il proposa l'utilisation de ce réactif pour compléter la réaction de Gmelin. Le réactif d'Ehrlich a été adapté par Fischer et Haberland (1935) (52-53-116) sur un ester de mésobilirubine ne différant de la bilirubine que par la présence de deux groupements éthyl au lieu de deux

groupements vynyl sur les noyaux pyrroles extérieurs. Dans une première phase, la molécule de mésobilirubine est clivée au niveau du pont méthène central avec formation de deux dipyrroles : l'hydroxypyrrométhène et l'hydroxypyrrométhènecarbinol. Le sel de diazonium se couple avec l'hydroxypyrrométhène pour donner un azopigment tandis que l'hydroxypyrrométhène carbinol se condense avec formation d'un nouveau bilirubinoïde. Ainsi une molécule de bilirubine donne une molécule d'azopigment.

Si la concentration en sel de diazonium est suffisamment forte, une molécule de bilirubine fournit deux molécules d'azopigment (73-102-104-120-125). Dans ces conditions, la réaction s'effectue en deux temps :

a) Bilirubine + sel de diazonium → azopigment + hydroxypyrrométhène carbinol.

b) Hydroxypyrrométhène carbinol + sel de diazonium → azopigment + formol.

Les deux azopigments formés sont identiques si l'on fait exception de l'arrangement asymétrique des groupements méthyl et vynyl des noyaux pyrroles extérieurs de la molécule de bilirubine. Ces isomères ont des spectres d'absorption identiques en lumière visible et on ne peut les séparer que par la chromatographie. En solution neutre ou légèrement acide, les pigments sont rouges (maximum : 530-540 nm) ; en solution alcaline, ils deviennent bleus (maximum : 600 nm) ainsi que dans les solutions fortement acides (maximum : 560 nm). Aussi considère-t-on dans la pratique qu'ils ne constituent qu'un seul pigment : l'azobilirubine.

La bilirubine, la dihydrobilirubine, la mésobilirubine donnent la diazoréaction, mais comme la bilirubine est le seul de ces pigments présent dans le sang, on peut utiliser la méthode de Van den Bergh pour le dosage de la bilirubine sanguine et cette diazoréaction est la base d'un grand nombre de méthodes de déterminaton des pigments biliaires dans le sérum.

Le principe général du dosage est d'ajouter un sel de diazonium ainsi qu'un accélérateur de la réaction à du sérum dilué ou non ; le sel de diazonium est préparé extemporanément en mélangeant une solution d'acide sulfanilique

dans l'acide chlorhydrique avec une solution aqueuse de nitrite de soude, mais la composition de ces solutions varie considérablement suivant les méthodes. L'accélérateur a pour but de favoriser la solubilisation de la bilirubine dans une phase où elle pourra réagir avec le sel de diazonium; la nature de l'accélérateur est variable : alcool éthylique, méthanol (101), caféine, urée, benzoate de sodium (87), acétate de sodium (124-25).

Le sel de diazonium peut réagir également avec les acides aminés et les phénols sanguins et la coloration jaune présentée par tous les sérums est due à une réaction au niveau de l'histidine et de la tyrosine des protéines sanguines (Vink, 1954) (105).

L'acide ascorbique réduit le sel de diazonium qui devient alors incapable de se coupler avec la bilirubine. La réaction est presque instantanée et peut être utilisée à tout instant pour interrompre la diazoréaction (120).

Bartels et Böhmer (8) ont décrit en 1969 une méthode utilisant la chloro-2-nitro-4-aniline stabilisée comme composant de diazotation, la copulation se faisant en milieu acide en présence d'ultravone comme agent solubilisant, la lecture entre 660 et 680 nm.

Iwata (82) mit au point en 1969 également un dosage spectrophotométrique basé sur la copulation d'un diazoïque préparé par diazoréaction de la sulfanilamide avec la bilirubine. La lecture se fait à 545 nm.

Luk'Janov (98) utilise également comme réactif la sulfanilamide diazotée et comme solvant pour la bilirubine l'alcool éthylique dilué.

Baryshkov, Mamontov et Vel'Tishchev (9) ont amélioré ces techniques pour lde dosages dans les petites quantités de sérum (0,2 ml).

Rappelons encore les travaux d'Ichida et Nobuoka (80), de Siggaard-Andersen et Komasmy (137), qui mesurent la bilirubine totale directement dans le plasma à 461 nm. La lecture est corrigée par celle qui mesure la turbidité et l'hémolyse (faite à 576 nm). Ils mesurent la bilirubine conjuguée sous forme d'azobilirubine à 576 nm.

Guraevsky (70) mesure également par méthode spectro-

colorimètrique la bilirubine totale, la bilirubine directe, indirecte et éthérosoluble du sérum sanguin et la bilirubine biliaire.

Overbeck, Vink et Deenstra (120) ont recherché la cinétique de l'accouplement avec l'acide sulfanilique diazoté. En 1955, ils ont publié des spectres très complets de la bilirubine, de son azodérivé et du carbinolpyrrométhène intermédiaire dans l'éthanol-chloroforme-acide chlorhydrique. En fait, on ne connaît pas en détail le spectre de l'azopigment glycuronique, bien qu'il soit assez semblable à celui du pigment non conjugué.

Ceci ouvre la possibilité de mesurer la bilirubine totale et les composés glycuroniques de bilirubine hydrolysables en milieu alcalin dans un mélange de ces substances.

L'utilisation de l'azodérivé alcalin bleu pour la spectrophotométrie de la bilirubine offre l'avantage supplémentaire de donner des solutions plus claires en présence de protéines et d'éviter toute erreur due à la présence d'hémoglobine, qui a un spectre d'absorption voisin de celui des azopigments rouges (en solution acide) (104-102-125). L'intensité de la couleur obtenue avec des mélanges de pigments biliaires dans les sérums humains varie considérablement avec le choix de l'agent d'accouplement.

La détermination des fractions de bilirubine réagissant directement ou indirectement a été largement utilisée en clinique.

On a utilisé des techniques et des durées d'accouplement différentes [par exemple 1 minute pour la réaction directe chez Watson (154-47)].

La méthode de Malloy et Evelyn (101) [décrite dans le paragraphe 7 du chapitre B II] utilisant le méthanol comme agent de diazotation, a été largement adoptée. Bien que sa base soit purement empirique, elle est très utile pour les diagnostics différentiels des ictères (25-111-7-119).

Cependant, par ce procédé, il n'est pas possible d'obtenir des déterminations spécifiques de bilirubine conjuguée et de bilirubine non conjuguée (39-19-84-141-33-122).

3. *Oxydation par le chlorure ferrique et spectrophotométrie du produit d'oxydation.*

Des méthodes, basées sur l'oxydation ont été décrites par Malloy et Evelyn (102) en 1938. Avec la chlorure ferrique, en solution acide, la bilirubine réagit pour donner une solution verte, contenant probablement de la biliverdine.

Ferro et Ham (51) ont appliqué ce principe pour la détermination de la bilirubine extraite par le mélange chloroforme-acétate d'éthyl.

La couleur obtenue a un maximum d'intensité à 660 nm. Les lipochromes présents dans le produit d'extraction n'interfèrent pas. La méthode donne des résultats que l'on peut reproduire facilement. Quelques produits de l'oxydation de la bilirubine présents dans l'extrait sont inclus dans les mesures.

La détermination des conjugués de la bilirubine restant dans la phase aqueuse après l'extraction est également possible après oxydation par le chlorure ferrique (51). La reproductibilité de cette détermination est bonne, mais les résultats ne reflètent pas nécessairement la concentration molaire totale des conjugués de la bilirubine puisque la nature chimique de quelques-uns des conjugués et de leurs produits d'oxydation nous est inconnue.

Cette méthode est simple et préférable à la détermination par méthode de Van den Bergh (réaction directe) pour l'estimation des conjugués de la bilirubine (chapitre V, paragraphe 7).

Rappelons ici les travaux de Zaroda (164) qui, pour obtenir la transformation de la bilirubine et de la biliverdine en un même composé coloré en bleu ou en gris, utilise comme agent oxydant le nitrite mercurique en solution nitrique; ensuite, il réalise le dosage spectrophotométrique.

4. *Détermination fluorimétrique de la bilirubine.*

Roth (126) a mis au point une méthode fluorimétrique pour la détermination de la bilirubine dans laquelle 50 µl de sérum sont mélangés à 600 µl d'acide phosphorique. Après une minute, on ajoute 3 µl d'eau et on mesure la fluorescence. Un témoin est préparé en ajoutant l'eau en premier. La longueur d'onde d'excitation est de 435 nm et la mesure d'émission est faite à 500 nm.

B. — APPLICATIONS

I. — Préparation de solutions standard.

1. *Bilirubine et mésobilirubine.*

De petites quantités de bilirubine peuvent être préparées à partir de la bile comme le décrivent Oskow, Hammakes et Schmid (117), Barrett, Mullins et Berlin (7).

Fog (56) a préparé une bilirubine très pure en passant une solution chloroformique à travers une colonne de sulfate de soude anhydre qui fixe la biliverdine, puis en cristallisant le pigment de façon bien déterminée.

Les solutions de bilirubine dans le chloroforme du commerce, qui contient 1 % d'éthanol, sont stables pendant plusieurs semaines avec une concentration élevée en bilirubine (par exemple 10 Moles/litre) quand elles sont gardées au froid et à l'obscurité.

Les solutions de formamide ou de diméthylsulfoxyde conviennent également.

Un comité représentant l'association américaine des chimistes cliniciens et d'autres sociétés a tenté de recommander des critères de pureté pour la préparation de bilirubine standard (75). Dybkaer et Hertz (48) ont obtenu de bons résultats en utilisant une solution standard de bilirubine dans de la formamide avec 0,1 M de cyanure de potassium.

Près de 3 % de la bilirubine sont solubles dans ce milieu. La solution peut être utilisée pour un enrichissement de sérum par standardisation de la spectrophotométrie directe des méthodes de diazotation. Il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de 20 µl de cette solution à 1 ml de sérum, dont le pH doit être ajusté à 9,5.

La mésobilirubine est préparée selon la méthode de Siedel (48).

2. *Bilirubine diglycuronide.*

La bilirubine à l'état pur n'est pas disponible. Une solution de référence, de concentration inconnue, contenant un mélange de conjugués de la bilirubine, principalement le diglycuronide, est préparée selon la méthode de Fog et Bakken (61) à partir de la bile, par chromatographie sur papier.

Un absorbant, contenant des conjugués de bilirubine peut être préparé sur kieselguhr comme l'ont décrit Watson, Campbell et Lowry (155) et a été employé comme substance standard pour la détermination de la bilirubine diglucuronide par Brodersen (30).

La quantité de bilirubine diglycuronide dans cette préparation peut être déterminée par une hydrolyse alcaline et une extraction au chloroforme. D'autres conjugués ainsi que nombre de substances non bilirubiniques sont également présents.

Lucassen (97) a préparé un mélange de bilirubine conjugués à partir de la bile par précipitation fractionnée avec l'acétone [Talafant (142-144)] comme suit : la bile est recueillie par un drain. On ajoute un volume de solution à 10 % de thiosulfate de soude à 10 volumes de bile. A la température de 5°, on ajoute une solution d'acide oxalique à 10 % jusqu'à ce que le pH soit égal à 6,0. Après centrifugation à basse température, on ajoute de l'acide oxalique au surnageant jusqu'à obtenir un pH de 6,5 où la bilirubine diglycuronide précipite. Le sédiment est lavé deux fois avec 50 ml de solution à 0,01 % d'acide oxalique pour 1 litre de bile. On met en solution ensuite le sédiment humide dans 200 ml d'acétone et on laisse reposer 2 heures à moins 15°. La filtration à basse température donne une solution jaune clair de laquelle on précipite la bilirubine diglycuronide par 0,1 M de soude dans une solution aqueuse à 96 % d'éthanol.

Le pH de la solution augmente par ce moyen de 5,0 à 7,0. Après centrifugation, le précipité est lavé deux fois par 20 ml d'acétone puis séché, puis lavé deux fois par 20 ml de diéthyl-éther, séché par le vide en présence d'acide sulfurique concentré.

La chromatographie de cette préparation par gel filtration sur Séphadex LH 20 dans une solution aqueuse à 50 %

d'éthanol, montre la présence de plusieurs pigments, dont la bilirubine diblycuronide comme principal composant. La substance solide contient 70 à 90 % de conjugué de bilirubine déterminé comme le diglycuronide.

Une préparation contenant de la bilirubine diglycuronide comme seule substance colorée et de pureté variant de 30 à 60 % est obtenue par la chromatographie mentionnée ci-dessus et l'évaporation à basse température. La substance amorphe peut être conservée plusieurs jours à moins 20°.

II. — Procédés.

1. *Bilirubine totale par diazotation.*

— Réactifs :

1) Mélange de Dyphylline : 20 grammes de dyphylline (7-dhydroxy-propyl-théophylline), 50 grammes d'acétate de sodium (3 H_2 O) sont dissouts dans 400 ml d'eau tiède; on filtre ensuite la solution.

2) Solution d'acide sulfanilique : 5,0 grammes d'acide sulfanilique, 15 ml d'acide chlorhydrique concentré, de l'eau en quantité suffisante pour 1 litre.

3) Solution de nitrite de sodium : 0,5 grammes de nitrite de sodium pour 100 ml d'eau. Ne conserver cette solution que moins de 2 semaines en bouteille teintée.

4) 100 ml du réactif 2 et 0,25 ml du réactif 3 à utiliser dans les heures qui suivent.

5) Solution d'acide ascorbique : 0,2 grammes d'acide ascorbique dans 5 ml d'eau. A conserver à l'abri de la lumière pendant moins d'une journée.

6) Solution II de Fehling : 100 grammes de soude, 350 grammes de tartrate double de sodium et de potassium, de l'eau en quantité suffisante pour 1 litre.

— Procédé :

1 ml de plasma, 2,0 ml du réactif 1, 0,5 ml du réactif 4 sont mélangés et laissés pendant 10 minutes. On ajoute ensuite 0,1 ml de réactif 5 puis immédiatement 1,5 ml de réactif 6. On mélange et on lit à 600 nm en face d'un témoin préparé en mélangeant les réactifs dans l'ordre suivant : réactifs 1, 5, 4, plasma, réactif 6. La couleur apparaît immédiatement et reste stable pendant 1 heure.

Cette méthode est une modification de la méthode de diazotation de Jendrassik et Grof (88). D'autres variantes d'exécution ont été proposées par Vychub (153).

Michaelsson (108-109-147) et Nosslin (114) introduisi-

rent l'emploi de la dyphylline (dérivé soluble de la caféine) à la place du benzoate de sodium et de caféine, qui donnait souvent naissance à une turbidité, et ajoutèrent de l'acide ascorbique, écartant par ce moyen les erreurs dues à la présence d'hémoglobine qui peut être oxydée en méthémoglobine par HNO_2. Ultérieurement, l'acide ascorbique inactive, l'acide diazobenzène-sulfonique, stoppant ainsi la diazotation lente de quelques conjugués de la bilirubine.

Ce procédé convient pour la détermination de la bilirubine totale et de la bilirubine conjuguée hydrolysable en milieu alcalin, aussi bien dans le plasma que dans le sérum. D'autres pigments biliaires diazotés sont inclus dans ces mesures en quantités plus ou moins importantes selon la rapidité de leur diazotation et le coefficient d'extinction de leurs azopigments (39-84). La sensibilité, déterminée par l'erreur moyenne d'une détermination, est de l'ordre de 1 ‰.

Thompson (147) a développé et modifié quelques points de la méthode de Michaelsson, en utilisant toujours la diphylline comme accélérateur.

Baer et Wood (4) ont ajouté la diphylline 2 minutes après le diazo-réactif, obtenant dans ce cas-là des valeurs plus importantes de bilirubine totale dans certains cas.

2) Bilirubine non conjuguée en présence d'oxyhémoglobine par spectrophotométrie directe.

— Procédé :

Le sérum est dilué, jusqu'à obtenir une extinction convenable, avec une solution aqueuse de tétraborate de potassium ($K_2 B_4 0_7, 4 H_2 O$). La concentration de cette substance dans la solution diluée doit être de 0,1 M. Le pH est alors de 9,3. Les coefficients d'extinction sont mesurés à 540 et 452 nm. La concentration en bilirubine exprimée en M/l est égale à : $20 (E_{452} — E_{540})$.

Dans le procédé actuel, des erreurs provenant de l'approximation de la longueur d'onde et de la largeur de la couche traversée sont importantes, puisque la mesure à 452 nm est réalisée sur la partie verticale de la courbe spectrale de l'oxyhémoglobine. Hertz et Dybkaer (76) éliminent ces erreurs de la façon suivante : la solution d'oxyhémoglobine est placée dans la cellule et on mesure à 540 nm,

longueur d'onde correspondant au maximum de l'échelle spectrale. On utilise ce procédé pour une mesure, puis on abaisse la longueur d'onde jusqu'à obtenir de nouveau l'extinction. A ce moment, la longueur d'onde se situant à proximité de 452 nm, on effectue une deuxième mesure.

La différence d'extinction trouvée dans un échantillon avec ces résultats est due à la bilirubine.

Cette méthode convient pour la détermination de la bilirubine libre fixée à l'albumine, dans les sérums d'enfants, lorsque les conjugués de la bilirubine, la méthémoglobine, les lipochromes, sont absents. Ce procédé corrige les erreurs dues à la présence d'oxyhémoglobine, souvent en quantité importante. La turbidité de ces sérums est généralement faible et on obtient sa correction en sachant que son extinction à 540 nm est environ les 2/3 de sa valeur à 452 nm.

Des méthodes basées sur le même principe, mais différant légèrement ont été proposées par différents auteurs (85-106-140-159).

3. Bilirubine non conjuguée mesurée par spectrophotométrie après précipitation des protéines par l'acétone (45-50-107).

— Réactif :

Acétone du commerce.

— Procédé :

On ajoute 1 volume de sérum à 25 volumes d'acétone. Après centrifugation, on mesure l'extinction du surnageant clair à 454 nm.

— Cette méthode est pratique et rapide pour la détermination de la bilirubine non conjuguée. Quand les autres pigments de la bile ne sont présents qu'en quantités relativement petites. Les lipochromes sont inclus dans le dosage. On utilise beaucoup cette méthode pour les sérums d'enfants dans lesquels la quantité de lipochromes correspond habituellement à une concentration en bilirubine voisine de 1 μM/ml, tandis que la concentration en bilirubine se situe entre 10 et 500 μM/ml. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 10 μM.

4. Bilirubines conjuguées et non-conjuguée par extraction et diazotation (158) :

— Réactifs :

1. Mélange de 5 volumes d'acétate d'éthyl et de 8 volumes d'acide lactique (solution à 85-95 %).

2) Chloroforme.

3) Diazo-réactif : 4 grammes d'acide sulfanilique et 60 ml d'acide chlorhydrique concentré additionnés d'eau en quantité suffisante pour 1 litre.

Extemporanement, on mélange 10 ml de cette solution avec 0,30 ml d'une solution à 2 % de nitrite de sodium. Ce mélange peut être conservé une douzaine d'heures.

4) Méthanol.

— Procédé :

Les échantillons de sérum sont conservés à l'abri de la lumière. On mélange 1,62 ml de réactif n° 1, 250 μl de sérum et 500 μl de chloroforme, on ajoute 30 μl de réactif n° 3, on agite doucement pendant 30 secondes et on centrifuge. Le mélange se sépare en deux phases claires, une phase inférieure de chloroforme contenant de la bilirubine non conjuguée et une phase aqueuse supérieure contenant les azopigments de la bilirubine conjuguée et colorée en violet. La bilirubine non conjuguée est mesurée dans la phase inférieure après diazotation : 700 μl de cette phase inférieure, 75 μl d'eau, 25 μl du réactif n° 3 et 500 μl de Méthanol sont mélangés et laissés pendant une heure à l'obscurité et à la température du Laboratoire.

On mesure l'extinction à 555 nm par rapport à un témoin d'eau distillée.

La bilirubine conjuguée est mesurée dans la phase supérieure, dont on conserve un échantillon pendant une heure à l'abri de l'air et à la température de la pièce. On effectue la mesure à 555 nm.

Cette méthode donne des résultats excellents; quelques complexes de bilirubine non conjuguée sont divisés et mesurés avec la bilirubine diglycuronide, de même que d'autres substances. Weber et Schalm (158) ont obtenu des valeurs supérieures de bilirubine non conjuguée après addition de bilirubine conjuguée. De plus, quand le sérum est conservé pendant plusieurs mois, on trouve par cette méthode des concentrations de bilirubine aux environs de 4 à 6 μM/ml,

alors que la méthode d'extraction par le chloroforme (décrite dans le paragraphe 6 du chapitre) donne des résultats plus exacts de 2 μM/ml. Ces discordances sont peut-être dues à la présence de complexes contenant de la bilirubine non conjuguée.

La sensibilité de cette méthode pour la détermination de la bilirubine non conjuguée est de l'ordre de 1 μM.

La concentration minimum pour la détermination des conjugués de la bilirubine est de l'ordre de 3 μ M/ml. Le sens des résultats en ce qui concerne les concentrations de bilirubine conjugée ne peut être évalué aussi longtemps que la nature chimique de certains conjugués est inconnue et que les substances standards convenables ne sont pas disponibles.

5) Milirubine conjuguée et non conjuguée par extraction et oxydation (51-34).

— Réactifs :

1) 50 ml d'acétate d'éthyl, 80 ml d'acide lactique et 20 mg de chlorure ferrique ($FeCl_3$, 6 H_2 O).

2) Chloroforme.

3) Mélange à volumes égaux du réactif n° 1 froid et d'acide dichloracétique. Laisser reposer pendant 24 heures avant l'emploi.

— Procédé :

Dans un tube fermé, on mélange 6 ml du réactif n° 1, 1 ml de sérum et 2 ml de chloroforme, on secoue doucement pendant 20-30 secondes et on centrifuge. On obtient deux phases nettement délimitées. On détermine la bilirubine non conjuguée dans la phase inférieure, dont on mélange 2 ml avec 1 ml d'eau et 4 ml de réactif n° 3 et on laisse pendant 10 minutes à 37°, puis pendant 20 minutes à la température du Laboratoire. On mesure l'extinction à 660 nm en face d'un témoin d'eau distillée.

Pour la détermination des conjugués de la bilirubine, on mélange 3 ml de la phase aqueuse supérieure, 1 ml d'eau, 2 ml du réactif n° 3, on laisse reposer et on mesure de la même façon que pour la bilirubine non conjuguée.

Pour la détermination de la bilirubine non conjuguée les

résultats de cette méthode sont très semblables à ceux obtenus par la méthode de Weber et Schalm (confert paragraphe 4 du présent chapître) et la sensibilité est du même ordre.

Dans cette méthode, les conjugués de la bilirubine sont oxydés en substances inconnues. Avec différentes préparations de conjugués de bilirubine, les résultats obtenus, par la méthode de Weber et Schalm et celle de Ferro et Ham ne sont pas parallèles, les différences se montant jusqu'à 50 %. Cette dernière méthode donne des résultats précis.

6) Bilirubine non conjuguée (et mésobilirubine) extraite par le chloroforme (28-29-35).

— Réactifs :

1) On mélange du chloroforme à un petit volume d'une solution de thiosulfate de sodium à 10 % dans un entonnoir de décantation à la température de 2-4°. On écarte les premiers millitiltres tirés au robinet d'arrêt. Après agitation, ce réactif peut être utilisé pendant 2 heures.

2) Tampon I : on mélange 20 mg d'acide salicylique, 3 grammes d'acide ascorbique, 2,7 grammes de K_2HPO_4, 9,5 ml d'une solution de potasse 2 N, de l'eau distillée en quantité suffisante pour 50 ml; on ajuste le pH à 8,1-8,2. Ce mélange peut être conservé au froid à l'abri de la lumière.

3) Tampon II : on mélange 3,8 g de glycérol, 50 ml d'une solution normale de soude, de l'eau distillée en quantité suffisante pour 1 litre, on ajoute le pH à 11,0.

Des échantillons de sérum sont préparés à l'abri de la lumière vive. Les échantillons provenant d'individus sains peuvent être conservés pendant 24 heures à 2°. Si le sérum contient de grandes quantités de bilirubine diglycuronide, il est nécessaire de recueillir le sang directement dans un tube refroidi, de centrifuger à basse température et de procéder sans délai, puisque la bilirubine diglycuronide est hydrolysée dans le sérum sanguin.

— Procédé :

On mélange 1 ml de sérum (contenant moins de 60 μ-Moles/litre de bilirubine, sinon on dilue précédemment), 1 ml de tampon I, 2 ml de chloroforme. Le tube est scellé par un bouchon de verre ou de plastique (le caoutchouc est à

rejeter) et agité pendant 2 minutes dans le sens de la longueur, selon une amplitude de 5 cm, à raison de 300 coups par minute. On centrifuge ensuite pendant 5 minutes à 12 000 tours par minute. Toutes ces opérations sont effectuées à 2° et à l'abri de la lumière. Echantillons et réactifs sont refroidis avant usage. Les opérations qui suivent sont effectuées à l'abri de la lumière à la température de la pièce. On mesure le pH de la phase aqueuse. La valeur optimale est de 8,0. S'il se situe au-dessous de 7,7 ou au-dessus de 8,3, on renouvelle l'analyse après adjonction d'un acide ou d'une base pour ajuster ce pH à 8,0.

On prélève la moitié du chloroforme qu'on mélange à un volume égal de tampon II en agitant pendant 1 minute.

On réalise cela dans un tube en matière plastique (polypropylène). Les résultats varient si on utilise un tube de verre. La phase de chloroforme, qui contient des carotènes et autres substances, mais pas de bilirubine, est employée comme témoin pour la détermination spectrophotométrique.

On retire ensuite le reste de chloroforme à la pipette. Une courbe spectrale est enregistrée et comparée avc une série de courbes standard sur papier transparent, obtenue avec de la bilirubine standard (ou de la mésobilirubine) dissoute dans le chloroforme. Si la bilirubine et la mésobilirubine sont toutes les deux présentes, on calcule leurs concentrations à partir des extinctions à deux longueurs d'onde (444 et 468 nm). Une courbe spectrale est calculée à partir des concentrations trouvées et est comparée avec des courbes expérimentales afin d'examiner si d'autres pigments contribuent au spectre trouvé.

La bilirubine ajoutée au sérum n'est retrouvée qu'à 60-90 % si le sérum enrichi est laissé à la température du Laboratoire pendant quelques minutes seulement.

On retrouve à 100 % la bilirubine ajoutée si l'adjonction est faite à basse température immédiatement avant l'analyse. On ne connaît pas la nature chimique du processus responsable de la perte en bilirubine à la température du Laboratoire. On peut encore retrouver à 100 % la bilirubine ajoutée par la méthode de Weber et Schalm ou celle de Ferro et Ham.

Il serait important de savoir si ces découvertes indiquent

une erreur systématique de la méthode de Brodersen et Vind ou un plus haut degré de spécificité (35).

La sensibilité de la méthode est de l'ordre de 0,1 μM pour 1 ml de sérum analysé.

On a utilisé une variante de cette méthode pour déterminer la bilirubine libre dans le liquide amniotique (36) en utilisant 2,5 ml de chaque produit (échantillon, tampon, chloroforme) et en mesurant dans une cuvette de 4 ou 6 cm. La sensibilité est de l'ordre de 10 μM/litre.

Cette méthode est recommandée lorsqu'on veut un maximum de spécificité et a été appliquée avec succès à l'étude de diverses affections hépatiques (148). En plusieurs occasions, les courbes spectrales de sérums pathologiques ont indiqué la présence de pigments inconnus.

7) Bilirubine totale diazotée par réaction directe de Malloy et Evelyn (46-72-93-101-110-114-144-162).

— Réactifs :

1) On mélange 15 ml d'acide chlorhydrique concentré, 1 gramme d'acide sulfanilique et de l'eau distillée en quantité suffisante pour 1 litre.

2) Solution à 0,5 % de nitrite de sodium.

3) On mélange 9,7 ml du réactif n° 1 et 0,3 ml de réactif n° 2 (à préparer extemporanément).

4) On mélange 15 ml d'acide chlorhydrique concentré et de l'eau distillée en quantité suffisante pour 1 litre.

5) Méthanol absolu.

— Procédé :

Le sérum est dilué au 1/10e dans de l'eau. Pour la détermination de la bilirubine totale, on mélange 4 ml de sérum dilué, 1 ml de réactif n° 3 et 5 ml de méthanol absolu; on laisse reposer pendant 30 minutes. On mesure au spectrophotomètre à 540 nm en utilisant pour témoin le même mélange en remplaçant le réactif n° 3 par le réactif n° 4.

La bilirubine directe est mesurée en remplaçant le méthanol par de l'eau en face d'un témoin analogue. Malloy et Evelyn ont déterminé un temps de 30 minutes pour obtenir la réaction directe, tandis que d'autres auteurs ont employé

des temps de 10 ou 1 minutes (47-154).

La bilirubine totale est déterminée par cette méthode avec une bonne précision. Les résultats, avec la plupart des sérums, son en accord avec ceux d'autres procédés utilisant la diazotation. La réaction directe augmente généralement avec la présence de bilirubine conjuguée, mais ne reflète pas numériquement sa concentration (17-19-33-136). La détermination de la bilirubine libre comme différence entre la bilirubine totale et la bilirubine directe n'est pas précise.

Cette méthode est souvent employée pour les travaux cliniques et est recommandée quand une comparaison avec des résultats précédents est essentielle.

D'autres travaux ont été réalisés par Ichida et Nobuoka (80), Kulhanek et Appelt (17).

8) Mesure de la bilirubine diglycuronide par dérivation des isotopes (30-86).

— Réactifs :

1) On dissout 1 gramme d'acide sulfanilique dans 15 ml d'acide chlorhydrique concentré et de l'eau en quantité suffisante pour 1 litre.

2) On prépare un réactif identique, mais où l'acide sulfanilique est marqué par du S^{35}, dont l'activité spécifique se situe autour de 10 Curie/Mole.

3) Solution de nitrite de sodium à 0,5 %.

4) Solution de sulfate d'ammonium à 0,5 %.

5) On mélange 600 μl du réactif n° 1 et 100 μl du réactif n° 3. L'excès d'HNO_2 est enlevé par addition de 600 du réactif n° 4. On ajoute 300 μl d'acide chlorhydrique en solution 2N. (Employer extemporanément).

6) On prépare un mélange équivalent au réactif n° 5, mais à partir du réactif n° 2 radioactif à la place du réactif n° 1.

7) Solution de nitrite de soude (0,2 M).

8) Solution de glycocolle (1,5 M) dont le pH est abaissé à 2,0 par adjonction d'acide sulfurique concentré.

9) N-Butanol, saturé par agitation avec un tiers de volume du réactif n° 8.

10) Chloroforme.

11) On dissout 138 g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4, H_2O) dans 6,8 ml d'acide phosphorique concentré et de l'eau en quantité suffisante pour 1 litre : on ajuste le pH à 3,0; on sature en agitant avec le réactif n° 12.

12) On sature avec le réactif n° 11 le mélange de 1 volume de n-butanol et de 2 volumes de chloroforme.

13) Solution de Soude Normale.

14) Solution d'acide phosphorique (4,4 moles/litre) [30 ml d'acide orthophosphorique 85 % et 70 ml d'eau].

— Procédé :

On dilue au dixième les échantillons contenant plus de 80 mM/l de bilirubine diglycuronide.

Une solution standard concentrée est tirée des conjugués de bilirubine préparés selon la méthode de Lucassen (96), ci-dessus (chapitre B-I, paragraphe 2) aux alentours de 200 mM/l dans le sérum. Un vieux sérum dans lequel la bilirubine à presque complètement disparu, convient très bien comme solvant. Cette solution contient un mélange de conjugués de bilirubine hydrolysables en milieu alcalin, la bilirubine diglycuronide étant le principal composant.

Après diazotation et hydrolyse alcaline comme suit, on obtient un seul azo-pigment, identique à l'azo-pigment de la bilirubine dans la chromatographie de Schmidt (chapître A-I, paragraphe 5). La solution standard doit actuellement être considéré comme ne contenant que de la bilirubine diglycuronide. Sa concentration est déterminée par méthodes de Jendrassik, Grof, Michaelsson et Nosslin (chapitre B VI, paragraphe 1). On conserve à basse température et dans l'obscurité la solution qu'il faut utiliser dans la journée.

On prépare des solutions diluées à partir de la solution précédente dans le sérum vieilli, qui ne contient pas de bilirubine diglycuronide ou dans un sérum où le conjugué a été enlevé par hydrolyse alcaline puis neutralisation (nous appellerons ce sérum vieilli dilué : solution porteuse ou solution x).

Immédiatement avant l'emploi, on prépare une solution

d'azopigment non radioactif. Pour chaque analyse à effectuer (y compris les déterminations standard) on mélange 1 ml de la solution standard concentrée et 0,5 ml du réactif n° 5, on laisse pendant 20 minutes à la température du Laboratoire (25°). Ainsi 99,8 % de la bilirubine diglycuronide se trouve transformés en azopigments. On stoppe le processus par addition de 100 de réactif n° 7 pour chaque millilitre de la solution standard concentrée.

1. Un millilitre de chaque solution standard diluée (y compris à concentration nulle) et un millilitre de chaque échantillon sont mélangés à 0,5 ml de réactif n° 6.

La diazotation est achevée à 99 % en 3 minutes à la température du Laboratoire et est alors stoppée par addition de 100 μl de réactif n° 7. L'acide diazobenzène sulfonique réagit avec le nitrate pour donner l'acide nitrobenzène sulfonique. L'inactivation se fait en 3 minutes.

2. A chaque tube, on ajoute 1,50 ml de la solution x obtenue ci-dessus. Comme il est indispensable d'empêcher la trace de bilirubine diglycuronide contenue (moins de 0,4 μM/ml) de réagir avec l'acide diazobenzène sulfonique radioactif, on prend soin qu'aucune gouttelette de la solution dans le tube échantillon n'échappe à l'inactivation par le nitrate de soude, ni que cette inactivation ne soit retardée après mélange à la solution porteuse.

3. Un millilitre du réactif n° 8 et trois millilitres du réactif n° 9 sont ajoutés. On agite les tubes dans le sens de la longueur à raison de 250 coups par minute de 5 cm d'amplitude pendant 2 minutes. On centrifuge ensuite pendant 20 minutes ou plus à 15 000 tours par minute.

4. Un millilitre et demi de la phase supérieure est mélangé à trois millilitres de chloroforme et agité comme précédemment avec un millilitre et demi de réactif n° 11.

En accord avec les découvertes de Schachter (130), on a montré que 90 % de l'azopigment glycuronide est présent dans la phase tampon (inférieure) et que tous les azopigments non conjugués restent dans le butanol-chloroforme.

Néanmoins, si l'échantillon contient une quantité importante de bilirubine libre, comme dans les sérums humains normaux où il y a 30 fois plus de bilirubine libre que de bilirubine conjuguée, une quantité significative d'azopig-

ments non conjugués se retrouve dans la phase tampon.

5. On extrait la phase tampon par 5 ml du réactif n° 12. Par ce second partage, la quantité de bilirubine non conjuguée comprise dans la détermination est réduite à environ 0,1 % de la quantité présente dans l'échantillon.

6. On prend 1 ml de la phase tampon auquel on ajoute 4 ml de soude normale pour obtenir l'hydrolyse de l'azopigment glycuronide. Cette hydrolyse est achevée en 1 minute. Un millilitre de la solution 4,4 Moles d'acide phosphorique par litre est ajouté à la fin de ce temps. L'opération peut alors être interrompue pendant la nuit si les solutions sont gardées au réfrigérateur.

7. L'azopigment diconjugué doit ensuite être séparé de l'acide nitrobenzène sulfonique radioactif, généralement en quantité plus grande que le pigment.

Les 6 ml du mélange de la réaction d'hydrolyse sont extraits par 5 ml du réactif n° 12.

8. La phase butanol-chloroforme est extraite par 10 ml de réactif n° 11.

9 et 10. La phase butanol-chloroforme est extraite deux fois de plus avec chaque fois 10 ml de réactif n° 11.

On réalise ces manipulations à une emplacement différent pour éviter la contamination radioactive.

On mesure l'extinction de la solution finale-butanol-chloroforme à 470, 530, 590 nm dans une cellule de 4 cm.

La moyenne des extinctions à 470 et 590 nm est soustraite de la valeur de l'extinction à 530 nm; ainsi on obtient la correction de la turbidité.

Deux millilitres de la solution butanol-chloroforme sont évaporés dans un évaporateur à anneaux concentriques comprimés. Une distribution reproductible de la matière déposée en résulte. La radioactivité est mesurée de préférence par un compteur à courant de méthane de fond peu important. La self absorption est négligeable.

Les radioactivités spécifiques sont calculées en divisant le nombre d'émissions reçues par minute par l'extinction corrigée. Ces chiffres sont relevés en face de concentrations connues et les concentrations standard et inconnues sont

obtenues à partir de cette courbe standard.

Le chiffre obtenu est la concentration en conjugués de bilirubine alcali-hydrolysable. Par l'étude de la cinétique de l'hydrolyse (6e temps du procédé), il est possible de vérifier l'identité d'un conjugué de l'acide glycuronique, d'après Brodersen (33).

Selon la concentration et la présence de protéines sériques, on retrouve en plus ou moins grande partie le conjugué de bilirubine ajouté. A une concentration allant de 10 à 100 μM/ml. On retrouve pratiquement 100 %. A une concentration normale de protéines sériques, on retrouve environ 70 %, si on ajoute 1 μM/ml de bilirubine diglycuronide. Dans ce dernier cas, la courbe standard obtenue est droite.

La sensibilité se situe autour de 0,01 mM/l dans le sérum et 0,1 mM/l dans le liquide amniotique. L'erreur moyenne d'une seule détermination dans le sérum provenant d'un homme normal de sexe masculin, qui a une concentration moyenne de 0,21 mM/l est de 0,016 mM/l.

Cette méthode a été employée pour la détermination de la formation de la bilirubine diglycuronide in vitro avec des tranches de foie, pour la détermination des concentrations sériques de bilirubine diglycuronique chez l'homme et la femme adultes normaux (54), chez les enfants nouveaux-nés (85-37), dans le liquide amniotique (36) et chez des patients à états cliniques variés (38-148).

9. Division par solvants et mesure de la bilirubine libre, de la bilirubine monoglycuronide et de la bilirubine diglycuronide (49) [méthode d'Eberlin].

— *Matériel :*

Pipettes graduées de 0,5 ml, 10 ml et 20 ml.
Tubes à essais de format courant.
Pipettes capillaires de Pasteur et ampoules de 6 ml de capacité.
Tubes adaptés au lumétron.
Centrifugeuse et tubes à décantation.
Lumétron.

— Réactifs :

1) Solution de phosphate monosodique (0,2 M/l) tampon-

née à pH : 5 par de la soude 5 N.

2) Acétate d'éthyl (Merck ou équivalent).

3) Alcool butylique (Merck ou équivalent).

— Procédé :

Dans deux tubes « E » et « B » est déposé 0,8 ml de plasma. A l'aide d'une pipette on transfert 7,2 ml de la solution tamponnée dans le tube « E », 8,8 ml dans le tube « B ».

Les deux tubes sont bouchés et secoués vigoureusement pendant 90 secondes, avec de brefs intervalles toutes les 30 secondes.

Une légère émulsion se forme dans le tube B. On centrifuge les contenus de 2 tubes à 3 000 tours par minute pendant 7 minutes, jusqu'à ce que la plus haute et la plus basse couche soient parfaitement claires, séparées par une fine interface de protéines.

A l'aide de pipettes de Pasteur, les plus hautes couches de E et de B, respectivement dénommées UE et UB sont transférées dans deux tubes de Lumétron, ainsi que la plus basse couche de B, LB.

Ces trois solutions sont lues à 580 et 460 nm en face d'un témoin d'eau distillée.

— Calculs :

En soustrayant la densité optique à 580 nm de celle à 460 nm, on obtient un résultat que l'on multiplie par un facteur constant.

A la couche UE correspond la bilirubine libre. A la couche UB correspond la somme de la bilirubine libre et de la bilirubine monoglycuronide. A la couche LB correspond la bilirubine diglycuronide.

Les fecteurs pour UE et UB sont obtenus par comparaison avec la méthode de Jendrassik (88), pour LB après calculs de ces deux facteurs.

Ces fecteurs doivent être redéterminés individuellement par le Laboratoire utilisant la méthode.

La présence de sulfates de bilirubine dans le plasma a été ignorée.

Quelques expériences d'Eberlein d'après les travaux d'Isselbacher (81) indiquent que le sulfate de bilirubine représente 5 à 15 % de la bilirubine plasmatique dans les phases UB et LB.

La couche LE ne convient pas à la mesure à cause de la perte variable de bilirubine conjuguée dans l'interface de protéines.

La composition des diverses couches fut précisée par chromatographie sur colonne à phase réversible et confirmée par élution à partir de la colonne de chromatographie. Bollman (21) a montré par ses travaux que seule une partie de la bilirubine monoglycuronide réagissait directement, ce qui montrait qu'elle était en fait un complexe de bilirubine libre et de bilirubine diglycuronire.

— Discussion :

Cette méthode de division est basée sur trois faits bien établis : la bilirubine totale peut-être mesurée avec exactitude par un spectrophotomètre de précision; la bilirubine libre peut-être extraite quantitativement d'une solution par divers solvants organiques; la bilirubine diglycuronide peut-être facilement séparée de la bilirubine libre et de la bilirubine monoglycuronide par la chromatographie sur colonne miniature à phase réversible [Billing (15)], en utilisant un système de solvants tamponnés et de butanol comme celui de la méthode de division d'Eberlein.

Il ne serait pas raisonnable de supposer qu'un procédé aussi simple que celui-ci puisse séparer tous les types de conjugués de bilirubine que l'on a découverts ou qu'on suppose existants.

On ne pourrait pas non plus accomplir un exploit par la chromatographie sur colonne.

Il y a dans cette méthode plusieurs sources d'erreurs qui doivent être soulignées : par exemple une extraction incomplète du solvant, par un contrôle non approprié du ph ou par une secousse intempestive.

Une turbidité marquée des couches au moment de la spectrophotométrie (par suite de la lipémie), une centrifugation de l'interface de protéines pendant l'aspiration de la couche aqueuse LB, une hémolyse marquée ou la vieillesse d'un

plasma limitent son emploi. Toutes les méthodes de titrage de la bilirubine sont également limitées par l'instabilité marquée des formes conjuguées de bilirubine.

Par sa simplicité et sa sensibilité, ce procédé semble convenir à l'étude et à la mesure pratique de la bilirubinémie.

II - DOSAGE DES FRACTIONS DE LA BILIRUBINE PLASMATIQUE CHEZ LE CHEVAL

Pour sa simplicité et sa sensibilité suffisante, nous avons choisi pour effectuer nos mesures, la méthode d'Eberlein (49) décrite à la fin du chapitre précédent.

Par comparaison à la méthode de Jendrassik et Graf (88) qui est la méthode habituelle de dosage de la bilirubinémie en médecine vétérinaire (55), nous obtenons pour valeur des facteurs :

— pour UE : 2,54.
— pour UB : 2,52;
— pour LB : 0,99.

Les résultats obtenus nous montrent que chez le cheval, les proportions de bilirubine monoglycuronide et de bilirubine diglycuronide sont variables, mais avec le plus souvent une prédominance importante de la fraction diconjuguée. réquemment, la bilirubine libre apparaît en quantité plus importante que la bilirubine conjuguée.

— BT : Bilirubine totale en mg/l;
— BC : Bilirubine conjuguée en mg/l;
— BMG : Bilirubine monoglycuronide en mg/l;
— BDG : Bilirubine diglycuronide en mg/l;
— BL : Bilirubine libre en mg/l;
— UE, UB et LB sont donnés en densité optique.

RESULTATS ETABLIS A PARTIR DE PLASMAS DE CHEVAUX SAINS

	Méthode de Jendrassik			Méthode d'Eberlein							
	BT	BC	BL	UE	UB	LB	BL	BL + BMC	BDC	BMC	BC	BT
1	7,3	2,1	5,2	1,5	1,8	1,0	3,8	4,5	1,0	0,7	1,7	5,5
2	10,6	5,2	5,4	1,8	3,7	4,0	4,6	6,8	5,0	2,2	7,2	11,8
3	11,4	4,9	6,5				6,3	9,3	4,0	3,0	7,0	13,3
4	14,1	6,0	8,1	2,8	4,5	4,0	7,1	11,3	4,0	4,2	8,2	15,3
5	15,1	7,3	7,8	3,1	3,6	3,5	7,9	9,0	3,5	1,1	4,6	12,5
6	17,3	8,8	8,5	3,9	4,2	2,7	9,9	10,5	2,7	0,6	3,3	13,2
7	20,5	9,75	10,75	5,6	6,5	2,0	14,2	16,3	2,0	2,1	4,1	18,3
8	22,75	8,1	14,6	4,75	7,6	6,2	11,9	19,0	6,2	7,1	13,3	25,2
9	25,0	10,4	14,6	3,8	7,4	1,4	9,6	18,5	1,4	8,9	10,3	19,9
10	11,1	7,6	3,5	1,8	3,7	4,9	4,6	9,3	4,9	4,7	9,6	14,2
11	16,5	8,5	8,0	3,5	5,4	1,4	8,9	13,5	1,4	4,6	6,0	14,9
12	10,0	4,8	5,2	2,0	2,7	5,0	5,1	6,8	5,0	1,7	6,7	11,8
13	15,5	7,3	8,2	2,7	3,5	7,0	6,9	8,8	7,0	1,9	8,9	15,8
14	7,0	4,0	3,0	1,6	1,4	4,0	4,1	3,5	4,0	—	4,0	8,1
15	14,2	6,0	8,2	3,0	3,7	3,3	7,6	9,3	3,3	2,7	6,0	13,6
16	17,0	7,2	9,9	3,9	4,1	2,8	9,9	10,3	2,8	0,4	3,2	13,1
17	8,8	4,7	4,1	2,0	2,5	5,1	5,1	6,8	5,1	1,7	6,8	11,9
18	13,0	5,4	7,6	2,8	4,4	3,8	7,1	11,0	3,8	3,9	7,7	14,8
19	24,3	6,6	17,7	5,0	8,0	6,5	12,7	20,2	6,5	7,5	14,0	26,7
20	6,0	3,2	2,8	1,7	1,7	1,0	4,3	4,3	1,0	0	1,0	5,3
21	21,5	8,0	12,5	5,5	6,5	1,9	13,9	16,3	1,9	2,4	4,3	18,2
22	9,7	4,5	5,2	2,6	3,8	4,2	6,6	9,6	4,2	3,0	7,2	13,9
23	10,2	4,7	5,5	2,3	2,9	4,9	5,8	7,4	4,9	1,6	6,5	12,3
24	8,1	5,1	3,0	1,7	1,8	3,7	4,3	4,5	3,7	0,2	3,9	8,2
25	7,0	4,3	2,7	1,3	1,7	4,0	3,3	4,3	4,0	1,0	5,0	8,3
26	8,3	4,0	4,3	2,7	2,9	4,0	6,9	7,3	4,0	0,4	6,3	12,0

	Valeurs extrêmes	Moyenne	s	s_n	C.V.
B T	6,0 — 25,0	13,6	5,7	1,1	41,8 %
B C	2,1 — 10,4	6,1	2,1	0,4	33,8 %
B L	2,7 — 17,7	7,4	4,0	0,8	53,7 %

	Valeurs extrêmes	Moyenne		n	C.V.
B T	5,3 — 26,7	13,8	5,0	1,0	36,6 %
B C	1,0 — 14,0	6,4	3,1	0,6	48,5 %
B L	3,3 — 14,2	7,4	3,1	0,6	42,5 %
B M C	0 — 8,9	2,6	2,4	0,5	91,6 %
B D C	1,0 — 7,0	3,3	1,6	0,3	43,7 %

Les taux obtenus par ces deux méthodes peuvent se comparer avec ceux de Wagenaar [Icterus Bij paard en rund. Tydsch Diergeneesk, 1966, 91, 21-30] (10 à 15 mg/l de Bilirubine libre, 3 à 5 mg/l de Bilirubine conjuguée), retrouvés par Bost (J.), Fontaine (M.), Jean-Blain (M.), Lapras (M.) et Magnat (A.) [Evaluation de certains constituants du sang chez les chevaux cliniquement normaux, Ann. Rech. vétér., 1970, 1 (I), 63-91.]
sur 194 chevaux de selle en bonne santé et ceux de Guimiot (V.) [Les Ictères du Cheval, Thèse Doctorat Vétérinaire, Lyon 1971, 30.] (Bilirubine totale : 3,5 à 30 mg/l, moyenne : 16,74 mg/l; Bilirubine directe : 1 à 10 mg/l, moyenne : 5,91 mg/l) obtenus par méthode de Jendrassik.

Nous avons comparé les résultats obtenus par méthode de Jendrassik et par la méthode d'Eberlein :

	Moyenne des différences	t de Student.
Pour : B T	2,1 mg/l	0,44 %
B C	2,4 mg/l	0,53 %
B L	1,5 mg/l	0,04 %

La valeur du t de Student est dans les trois cas inférieure à 2,06, valeur donnée par la table de Student pour 26 mesures au risque d'erreur de 5 %. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux méthodes pour les valeurs de bili-

rubine totale, de bilirubine glycurono-conjuguée et de bilirubine libre.

RESULTATS ETABLIS A L'AIDE DE BILIRUBINE STANDARD (BIOTROL BILIRUBINE, SERUM ETALON BIOCHIMIQUE) DILUE DANS DE L'EAU DISTILLÉE PUIS DANS DU SOLUTE ISOTONIQUE DE CHLORURE DE SODIUM

Méthode de JENDRASSIK			Méthode d'EBERLEIN							
BT	BC	BL	UE	UB	LB	BL	BL + BMC	BDC	BMC	BC	BT
4,5	2,4	2,1	1,7	2,4	0,4	2,5	4,7	0,6	2,2	2,8	5,3
5,9	3,1	2,8	1,5	2,1	0,6	2,75	4,1	0,9	1,3	2,2	5,0
6,7	3,7	3,0	2,0	4,1	1,0	3,0	8,0	1,6	5,0	6,6	9,6
8,9	4,9	4,0	2,6	4,8	2,2	3,9	9,4	3,5	5,5	9,0	12,9
11,8	6,6	5,2	2,9	5,4	2,0	4,5	10,6	3,2	6,1	9,3	13,8
15,9	8,9	7,0	4,7	7,3	1,9	7,0	14,3	3,0	7,3	10,3	17,3
16,75	9,4	7,35	4,8	7,5	1,8	7,2	14,7	2,8	7,5	10,3	17,5
17,6	9,9	7,7	5,0	6,5	1,8	7,5	12,7	2,8	5,2	8,0	15,5
17,9	10,0	7,9	5,4	6,5	1,6	8,1	12,7	2,5	4,6	7,1	15,2
23,5	13,2	10,3	7,9	7,9	2,5	11,8	15,5	3,9	3,7	7,6	19,4
31,3	17,5	13,8	9,5	14,0	3,0	13,3	27,4	4,7	14,1	18,8	32,1

Ces résultats nous montrent qu'il faut utiliser des coefficients différents pour ces solutés et pour le plasma des chevaux. Les coefficients trouvé sont 1,50 pour UE, 1,96 pour UB et 1,58 pour LB.

Ces résultats soulignent le manque de précision dans la mesure de la fraction diconjuguée de bilirubine.

Malgré les améliorations apportées à la méthode d'Eberlein par Andreeva et Nikitina (3), Bljuger, Krupnikova, Gromova et Sondore (18) soulignent un défaut majeur de cette méthode, qui consiste en une perte appréciable de bilirubine libre et de bilirubine liée, au moment de la précipitation des protéines sériques.

Néanmoins, cette méthode compense sa médiocrité dans la précision par sa simplicité et sa rapidité et peut permettre de nombreux dosages indicatifs, surtout si on recherche l'importance des fractions mono et diglycuronides dans le taux de bilirubine conjuguée (63).

Nous avons tenté de doser les fractions libres, monoglycuronide et diglycuronide de la bilirubine dans le plasma de chiens normaux par la méthode d'Eberlein, mais celle-ci s'est révélée moins sensible que la méthode de Jendrassik et Graf habituellement utilisée.

CONCLUSION

VU :
Le Directeur
de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

R. FLORIO

VU :
Le Président de la Thèse

GADRAT

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 6-10-72
Le Président de l'Université
Paul-Sabatier
L. LARENG

Après avoir développé les principes des diverses méthodes de dosage de la bilirubinémie, nous avons décrit ces méthodes et précisé leur valeur.

Ce sont ces méthodes utilisées en médecine humaine que l'on se contente d'appliquer chez les animaux domestiques, pour lesquels nous manquons actuellement de méthodes de dosage spécifiquement adaptées. Nous avons choisi de comparer l'une de ces méthodes, celle d'Eberlein, à la méthode de Jendrassik et Graf, la plus couramment employée en médecine vétérinaire, pour déterminer chez 26 chevaux sains les concentrations plasmatiques des fractions libres, monoglycuronide et diglycuronide de la bilirubine.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Par méthode d'EBERLEIN :	Valeur moyenne	Valeurs extrêmes
Bilirubine libre	7,4 mg/l	3,3 — 14,2 mg/l
Bilirubine mono-glycuronide ..	2,6 mg/l	0 — 8,9 mg/l
Bilirubine diglycuronide	3,8 mg/l	1,0 — 7,0 mg/l
Bilirubine glycurono-conjuguée.	6,4 mg/l	1,0 — 14,0 mg/l
Bilirubine totale	13,6 mg/l	5,3 — 26,7 mg/l
Par méthode de JENDRASSIK et GRAF :		
Bilirubine libre	7,4 mg/l	2,7 — 17,7 mg/l
Bilirubine glycurono-conjuguée.	6,1 mg/l	2,1 — 10,4 mg/l
Bilirubine totale	13,6 mg/l	6,0 — 25,0 mg/l

La précision dans les résultats est comparable pour la bilirubine totale, la méthode d'Eberlein offrant l'avantage de doser la bilirubine mon-glycuronide et la bilirubine diglycuronide séparément.

Techniquement, ces deux méthodes sont d'un emploi aussi simple et rapide et peuvent être utilisées en laboratoire vétérinaire dans la recherche courante des taux des fractions glycurono-conjuguée et libre de la bilirubine dans le plasma de cheval.

Pour la recherche du taux de bilirubine dans le sang de carnivores domestiques non atteints d'ictère, il est préférable d'utiliser la méthode de Jendrassik et Graf à celle d'Eberlein, beaucoup moins sensible aux faibles concentrations.

BIBLIOGRAPHIE

1. Akuni (M.). — Studies on the bilirubin due to chromatography, Igaku Kenkyu, 1952, **22**, 109.

2. Abelson (N.M.) et Boggs (T.R.). — Am. J. Diseases Children, 1953, **86**, 461.

3. Andreeva (I.V.) et Nikitina (E.I.). — En russe : Dosage photoélectrocolorimétrique de trois fractions de bilirubine, Lab. Delo SSSR, 1968, **12**, 745-746.

4. Baer (D.M.) et Wood (D.C.). — Clin. Chim. Acta, 1961, **17**, 1.

5. Baikie (A.G.). — The chromotagraphie separation of the serum bile pigments in jaundice, Scot. Med. J., 1957, **2**, 359.

6. Barac (G.). — Dosage de la bilirubine dans l'urine par photométrie et par diazoréaction, C.R. Soc. Biol., 1945 ,**139**, 412.

7. Barrett (P.V.D.), Mullins (F.X.) et Berlin (N.I.). — J. Lab. Clin. Med., 1966, **68**, 905.

8. Bartels (H.) et Böhmer (M.). — Eine empfindliche method zur bilirubin - bestimmung, Z. clin. chem. klin. Biochem., Dtsch, 1969, **7**, 444-447.

9. Baryshkov (Ju.A.), Mamontov (V.I.) et Vel'tishchev (Ju.E.). — En russe : Sur la méthode de dosage de la bilirubine dans les petites quantités de sérum sanguin, Lab. Delo. SSSR, 1966, **8**, 469-470.

10. Baumgärtel (T.). — In Physiologie und Pathologie des Bilirubinstoffwechsels als Grundlagen der Ikterusforchung, Stuttgart, 1950, 136.

11. Beck (K.). — Ikterus, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1968, pp. 5-10.

12. Bennhold (H.). — Med. Kinderheilkunde, 1932, **42**, 273.

13. Bennhold (H.). — Acta Med. Scand., 1966, **445**, 222.

14. Billing (B.H.), Cole (P.G.) et Lathe (G.H.). — The excretion of bilirubin as a diglucuronide Giving the Direct Van den Bergh Reaction, Biochem. J., 1957, **65**, 774.

15. Billing (B.H.). — A chromatographie method for determination of the three pigments in serum, J. Clin. Path., 1955, **8**, 126.

16. Billing (B.H.). — A chromatographie method for determination of the three pigments in serum, J. Clin. Path., 1955, **8**, 130.

17. Blondheim (S.H.) et Kaufmann (N.A.). — J. Lab. Clin. Med., 1965, **65**, 659.

18. Bljuger (A.F.), Krupnikova (E.Z.), Gromova (G.K.) et Sondore (V.Ju.). — En russe : Critique de la méthode d'Eberlein de dosage des fractions de bilirubine dans le sérum sanguin, Lab. Delo SSSR, 1969, **4**, 223-228.

19. Boerth (R.C.), Blatt (A.H.) et Spratt (J.L.). — J. Lab. Clin. Med., 1965, **65**, 475.

20. Boggs (T.R.) et Abelson (N.M.). — Pediatries, 1966, **17**, 461.

21. Bollman (J.L.). — Bile pigments in serum in disease of liver, Symposium International « Hepatitis Frontiers », 1957, **37**, 467.

22. Bouchier (I.A.D.) et Cooperband (S.R.). — Isolation and characterisation of a macromolecular aggregate associated with bilirubin, Clin. Chim. Acta., 1956, **1**, 154.

23. Bourrillon (R.). — Isolement et propriétés du complexe bilirubineserumalbumine du serum, Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, **39**, 385.

24. Bourrillon (R.). — Interactions de la bilirubine avec les protéines sériques, Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, **38**, 675.

25. Boutwell (J.H.). — Clin. Chem., 1964, **10**, 197.

26. Bratlid (D.) et Winsnes (A.). — Determination of

conjugated and inconjugated bilirubin by methods based on direct spectrophotometry and chloroform extraction. A Reappraisal, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1971, **28**, 41.

27. Brodersen (R.) et Jacobsen (J.). — Separation and determination of bile pigment, Meth. biochem. Anal., 1969, **17**, 31.

28. Brodersen (R.) et Vind (I.). — A specific method for quantitativ determination of unconjugated bilirubin and mesobilirubin, Scand. J. Clin. Pathol., 1966, **19**, 90.

29. Brodersen (R.) et Vind (I.). — Chloroform extraction of serum bilirubin in relation to its binding to protein, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, **15**, 107.

30. Brodersen (R.). — Bilirubin diglucuronide in normal human blood serum, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1966, **18**, 361.

31. Brodersen (R.). — Acta Chem. Scand., 1966, **20**, 2895.

32. Brodersen (R.), Flodgaard (H.) et Krogh-Hansen (J.). — Intramolecular hydrogen bunding in bilirubin, Acta Chem. Scand., 1967, **121**, 2284.

33. Brodersen (R.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1960, **12**, 25.

34. Brodersen (R.) et Vind (I.). — A specific method for quantitative determination of unconjagated bilirubin and mesobilirubin, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, **15**, 225.

35. Brodersen (R.), Hermann (L.S.) et Vind (I.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, **15**, 523.

36. Brodersen (R.), Jacobsen (J.), Hertz (H.), Rebbe (H.) et Sorensen (B.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, **20**, 41.

37. Brodersen (R.) et Jacobsen (J.). — Bilirubin Metabolism I.A.D. Bouchier and B. Billing, Blackwell eds, Oxford, 1967, 111.

38. Brodersen (R.) et Tygstrup (N.). — J. Brit. Soc. Gastroenterology, 1967, **8**, 46.

39. Brükner (J.). — Estimation of the direct and total bilirubin in serum, Clin. Chim. Acta, 1961, **6**, 370.

40. Castex (M.R.), Lopez-Garcia (A.) et Zelasco (J.F.). — Estadio de la bilirubinemia total directa a indirecta por medio de un metodo de dosaje espectrofotometrico, Ann. Invest. Fis. Pat. Hum, 1940, **1**, 109.

41. Clarke (J.T.), — Clin. Chem., 1965, **11**, 681.

42. Cole (P.G.), Lathe (G.H.) et Billing (B.H.). — Separation of the bile pigments of serum, bile and urine, Biochem. J., 1954, **57**, 514.

43. Cole (P.G.) et Lathe (G.H.). — The separation of serum pigments giving the direct and indirect van den Bergh reaction, J. Clin. Path., 1953, **6**, 99.

44. Cremer (R.J.), Perryman (P.W.) et Richards (D.H.). — Influence of light un the hyperbilirubinemia of infants, Lancet, 1958, **1**, 1094.

45. Davidson (L.T.), Merritt (K.K.) et Weech (A.A.). — Am. J. Diseases Children, 1941, **61**, 958.

46. Dorche (J.) et Monnet (L.). — Sur le dosage de la bilirubine dite « directe », Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 1958, **2**, 59.

47. Ducci (H.) et Watson (C.J.). — The quantitative determination of the serum bilirubin with special reference to the prompt reacting and the chloroform soluble types, J. Lab. Clin. Med., 1945, **30**, 293.

48. Dybkaer (R.) et Hertz (H.). — Intern. Congr. Clin. Chem., 6 th., Munich, 1966.

49. Eberlein (W.R.). — A simple solvent - partition method for measurement of free and conjugated bilirubin in serum, Pediatries, 1960, **25**, 878-885.

50. Ernst (Z.) et Forster (J.). — Klin Wochhsch, 1924, **3**, 2386.

51. Ferro (P.V.) et Ham (A.B.). — A new method for total, free, and conjugated serum bilirubin, Amer. J. Clin. Pathol., 1967, **47**, 472-480.

52. Fischer (H.) et Barrensheen (H.). — Z. Physiol. Chem., 1921, **115**, 94.

53. Fischer (H.) et Haberland (H.W.). — Über die konstitution des Bilirubins sowie die seiner Azofarbstoffe und die gmelische Reaktion, Z. Physiol. Chem., 1935, **232**, 236.

54. Flodgaard (H.) et Brodersen (R.). — Seand J. Clin. Lab. Invest., 1967, **19**, 149.

55. Florio (R.), Lescure (F.), Guelfi (J.F.), Rico (A.G.) et Lorgue (G.). — Renseignements fournis par l'examen biochimique du sang chez les carnivores et les équidés domestiques, Revue Méd. Vét., 1971, **122**, 2, 95-104.

56. Fog (J.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1964, **16**, 49.

57. Fog (J.) et Bakken (A.F.). — Sonjugated and unconjugated bilirubin determined in icteric sera by direct spectrophotometry, Scand. J. Clin., Lab. Invest., 1967, **20**, 88.

58. Fog (J.) et Brugge-Asperheim (B.). — Nature, 1964, **203**, 756.

59. Fog (J.) et Jellum (E.). — Nature, 1963, **198**, 88.

60. Fog (J.). — Proc. Northern Pediat. Congr., 14 th., Stockholm, 1964, 23.

61. Fog (J.), Bratlid (D.), Winsnes (A.) et Bakken (A.F.). — Determination of unconjugated bilirubin as an azopigment after chloroform extraction from protein solutions, IIIrd Meeting of the European Association for the Study of the Liver (E.A.S.L.), Modena, 1968.

62. Gaidano (G.), Pagliardi (E.) et Favero (A.). — L'analisi degli azopigmenti bilirubinici mediante cromatografia su strato sottile, Fegato, 1965, **11**, 384-395.

63. Gallo (A.B.). — La determinazione spettrofotometrica delle frazioni bilirubiniche plasmatiche mediante il metodo delle separazione in solventi, Biochim. appl., Ital., 1967, **14**, 56-57.

64. Gjovanetti (S.), Maggiore (Q.) et Vivaldi (G.). — Separation by paper chromatography of varioux fractions of conjugated bilirubin decuring in Human bile, Ital. J. Biochem., 1961, **10**, 88.

65. Girard (M.L.), Paolaggi (F.) et Frappier (F.). — Ann.

Biol. Clin., 1965, **23**, 279.

66. Gladtke (E.). — Die Bilirubin - bestimmung nach Ferro und Ham in Serum, Z. Klin. Chem. Biochem., 1967, **5**, 63-64.

67. Gregory (C.H.) et Watson (C.J.). — Studies of conjugates bilirubin. II - Proflem of sulfate of bilirubin invivo and in vitro, J. Lab. Clin. Med., 1962, **60**, 1-17.

68. Gregory (C.H.). — J. Lab. Clin. Med., 1963, **61**, 917.

69. Grünenberg (K.). — Zschr. Exptl. Med., 1923, **31**, 119.

70. Guraevskij (A.P.). — En russe : Méthode de dosage des fractions de bilirubine, Lab. Delo SSSR, 1968, **10**, 581-585.

71. Harbison (R.D.), Boerth (R.C.) et Spratt (J.L.). — Quantitative determination of free and conjugated bilirubin by diazo-coupling and a liquid-extraction and column-chromatographie technique, Biochem. J., 1967, **104**, 466-476.

72. Hayashi (H.). — Etude de la réaction de Van den Bergh sur la bilirubine du sang, Presse Méd., 1929, **37**, 320.

73. Heirwegh (K.P.M.). — Intern. Symp. Jaundice, Freiburg, 1967.

74. Henry (R.J.), Golub (O.J.), Berkman (S.) et Segalove (M.). — Am. J. Clin. Path., 1953, **23**, 841.

75. Henry (R.J.), Ibott (F.), Mather (A.), Faulkner (W.) et Meites (S.). — Committee recommandation, Clin. Chem., 1962, **8**, 405.

76. Hertz (H.) et Dybkaer (R.). — Intern. Congr. Clin. Chem., 6 th, Münich, 1966.

77. Howard (G.A.) et Martin (A.J.P.). — The separation of the C_{12}-C_{13} Fatty Acids by reversed-phase partition chromatography, Biochem. J., 1950, **46**, 532.

78. Howe (R.B.) et Pinto (S. de T.). — Medicine, 1966, **45**, 523.

79. Ibott (F.A.) et O'Brien (D.). — Pediatries, 1964, **34**, 418.

80. Ichida (T.) et Nobuoka (M.). — Ultramicromethod for determination of total and direct bilirubin in serum by modified « alkaline azobilirubin blue » reaction, Clin. Chim. Acta, 1968, **20**, 532.

81. Isselbacher (K.J.) et McCarthy (E.C.). — Studies un bilirubin sulfate and other non glucuronide conjugates of bilirubin, J. Clin. Invest., 1959, **38**, 645-651.

82. Iwata (J.). — En japonais : Dosage colorimétrique rapide de la bilirubine totale dans le sérum, Jap. Analyst, 1969, **18**, 431-434.

83. Jackson (S.H.) et Hernandez (A.H.). — A new bilirubinometer and its use in estimating total and conjugated bilirubin in serum, Clin. Chem., 1970, **16**, 465.

84. Jacobs (S.L.), Henry (R.J.) et Segalove (M.). — Clin. Chem., **10**, 433.

85. Jacobsen (J.), Brodersen (R.) et Trolle (D.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, **20**, 249.

86. Jansen (H.) et Billing (B.H.). — Further evidence in support of the existence of bilirubin monoglucuronide as a chemical entity rather than as a complex, Bile Pigment Meeting, Aarhus, 1970.

87. Jendrassik (L.) et Cleghorn (R.A.). — Photometrische Bilirubin bestimmung, Biochem. Z., 1936, **289**, 1.

88. Jendrassik (L.) et Graf (P.). — Vereimfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins, Biochem. Ztschr, 1938, **297**, 81.

89. Kawai (K.). — Studies on paper chromatography of hemoglobin decomposition product. IV. On the paper chromatography of bilirubin, Igaku Kenkyu, 1953, **23**, 24.

90. Kuenzle (C.C.), Sommerhalder (M.), Ruttner (J.R.) et Maier (C.). — Separation and quantitative estimation of four bilirubin fractions from serum and of three bilirubin fractions from bile, J. Lab. and Clin. Med., 1966, **67**, 282.

91. Kuenzle (C.C.), Maier (C.) et Rüttner (J.R.). — The nature of four bilirubin fractions from serum and

of three bilirubin fractions from bile, J. Lab. and Clin. Med., **67**, 294.

92. Kuenzle (C.C.), Sommerhalder (M.), Maier (C.) et Rüttner (J.R.). — Die vier Serumbilirubin-Fraktionen bei der ikterischen Lebereirrhose, Schweiz. Med. Wehnschr., 1963, **93**, 695.

93. Kulhánek (V.) et Appelt (J.). — A new simple and rapid method for the determination of total serum bilirubin, Clin. Chim. Acta, 1968, **20**, 29-36.

94. Lathe (G.H.), Lord (R.) et Tothill (C.). — Transport function of plasma proteins, P. Desgrez et P.M. de Traverse Eds, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 129.

95. Levkoff (A.H.), Westphal (M.C.) et Finklea (J.F.). — Am. J. of Clin. Path., 1970, 54, 563.

96. Lozzio (B.), Garay (E.R.) et Royer (M.). — Gastroenterologia, 1964, **101**, 150.

97. Luk'Janov (L.T.). — En russe : La méthode de dosage à l'aide d'alcool de la bilirubine et de ses fractions dans le sérum sanguin, Lab. Delo SSSR, 1967, **2**, 108-110.

99. Maggiore (Q.), Nicolai (L.) et Giovanetti (G.). — Ital. J. Biochem., 1961, **10**, 329.

100. Maggiore (Q.), Nicolai (L.) et Giovanetti (G.). — Ital. J. Biochem., 1961, **10**, 88.

101. Malloy (H.T.) et Evelyn (K.A.). — The determination of bilirubin with the photooelectric colorimeter, J. Biol. Chem., 1937, **119**, 481.

102. Mareland (F.B.), O'Donnel (W.W.), Gast (J.H.) et McGinn (M.). — Federation Proc., 1950, **9**, 207.

103. Martin (N.H.). — Preparation and properties of serum and plasma proteins - XXI - Interactions With bilirubin, J. Am. Chem. Soc., 1949, **71**, 1230.

104. May (C.E.), Martindale (R.) et Boyd (W.F.). — J. Biol. Chem., 1934, **104**, 255.

105. Meignier (B.C.). — Recherches bibliographiques sur la bilirubine et la bilirubinémie chez l'homme et les animaux domestiques, Thèse Vét., Toulouse, 1969.

106. Meites (S.) et Hogg (C.K.). — Clin. Chem., 1960, **6**, 421.

107. Mertz (J.E.) et West (C.D.). — Am. J. Diseases Children, 1956, **91**, 19.

108. Michaëlsson (M.). — Bilirubin determination in serum and urine, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, **13**, Suppl. 56.

109. Michaëlsson (M.), Nosslin (B.) et Sjolin (S.). — Pediatries, 1965, **35**, 925.

110. Monnet (L.). — Thèse Doctorat Pharmacie Etat, Lyon, 1961.

111. Moretti (G.F.), Staeffer (I.), Demangi (G.) et Ballan (P.). — Bilirubinémie directe et indirecte. Persistant intérêt de la technique de Malloy et Evelyn pour leur dosage. Données fournies et problèmes posés par 120 déterminations chez 50 ictériques, Sem. Hôp., 1960, **36**, 2031.

112. Nakayama (H.) et Miyaka (H.). — Kyushu J. Med. Sci., 1963, **14**, 431.

113. Noir (B.A.), Garay (E.R.) et Royer (M.). — Biochem. Biophys. Acta, 1965, **100**, 403.

114. Nosslin (B.). — The direct diazoreaction of bile pigments in serum. Experimental and clinical studies, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1960, **12**, Suppl. 49.

115. Odell (G.B.). — Studies on kern-icterus. The protein binding of bilirubin, J. Clin. Tnvest., 1959, **38**, 823.

116. Orndorff (W.R.) et Teeple (J.E.). — Am. Chem. J., 1905, **33**, 215.

117. Ostrow (J.D.), Hammaker (L.) et Schmid (R.). — J. Clin. Invest., 1961, **40**, 1442.

118. Ostrow (J.D.), Schmid (R.) et Samuelson (D.). — The protein binding of 14C bilirubin in human and murin serum, J. Clin. Invest., 1963, **42**, 1286-1299.

119. Overbeck (J.T.G.), Vink (C.L.) et Deenstr3 (H.). — Kinetics of the formation of azobilirubin, Rec. Trav. Chim., 1955, **74**, 81.

120. Overbeck (J.T.G.), Vink (C.L.) et Deenstra (H.). —

Kinetics of the formation of azobilirubin, Rec. Trav. Chim., 1955, **74**, 85.

121. Pennington (G.W.) et Hall (R.). — Method for the determination of small amounts of bilirubin in liquor amnii and other body fluids, J. Clin. Path., 1966, **19**, 90.

122. Perrelli (W.V.) et Watson (C.J.). — Comparison of the Weber-Scholm method with the Ducci-Watson modification of the Malloy-Evelyn method for serum bilirubin determination, Clin. Chem., 1970, **16**, 239-246.

123. Petryka (Z.J.). — Densitometrie determination of bile pigment on thin layer chromatogram, J. Chronomatogr., 1970, **50**, 447.

124. Powell (W.N.). — Am. J. Clin. Pathol., 1944, **8**, 55.

125. Rand (R.N.) et Pasqua (A.D.). — Clin. Chem., 1962, **8**, 570.

126. Roth (M.). — Dosage fluorimétrique de la bilirubine, Clin. Chim. Acta, 1967, **17**, 487-492.

127. Sato (T.). — Tohoku J. Exptl. Med., 1962, **77**, 83.

128. Sato (T.) et Saitoh (T.). — Tohoky J. Exptl. Med., 1965, **84**, 329.

129. Schachter (D.). — Nature of the glucuronide in direct reacting bilirubin, Science, 1957, **126**, 507.

130. Schachter (D.). — Estimation of bilirubin mono-and diglucuronide in the plasma and urine of patients with non-hemolytic jaundice, J. Lab. Clin. Med., 1959, **53**, 557.

131. Schellong (G.) et Vende (V.). — Teknik für die Eichung von Methoden zur Serumbilirubin-Bestimmung, Klin-Wehnschr., 1960, **38**, 703.

132. Schmid (R.). — Direct-reacting bilirubin, bilirubin glucuronide, in serum, bile and urine, 1956, **124**, 76.

133. Schmid (R.). — The identification of direct-reacting bilirubin as bilirubin glucuronide, J. Biol. Chem., 1957, **229**, 881.

134. Schoenfield (L.J.), Bollman (J.L.) et Hoffman (H.N.).

— Sulfate and glucuronide conjugates of bilirubin in experimental lever injury, J. Clin. Invest., 1962, **44**, 133.

135. Schoenfield (L.J.), Bollman (J.L.) et Hoffman (H.N.). — Sulfate and glucuronide conjugates of bilirubin in experimental lever injury, J. Clin. Invest., 1962, **44**, 137.

136. Schoenfield (L.J.), Foulk (W.T.) et Bollman (J.L.). — Gastroenterology, 1964, **47**, 35.

137. Siggaard-Andersen (O.) et Komarmy (L.E.). — A simple bilirubinometer for ultramicro determination of total and conjugated plasma bilirubin, Lab. Delo SSSR, 1968, **7**, 445.

138. Sommerhalder (M.), Kuenzle (C.), Rüttner (J.R.) et Maier (C.). — Die vier Serumbilirubin-Fraktionen beim frischen experimentellen Verschlussikterus der Ratte, Med. Exper., 1962, **7**, 196.

139. Sommerhalder (M.), Kuenzle (C.), Rüttner (J.R.) et Maier (C.). — Die vier Serumbilirubin-Fraktonen beim Okklusionsicterus, Helvet. Med. Acta, 1962, **29**, 607.

140. Stevenson (G.W.), Jacobs (S.L.) et Henry (R.J.). — Clin. Chem., 1964, **10**, 95.

141. Stoner (R.E.) et Weisberg (H.F.). — Clin. Chem., 1957, **3**, 22.

142. Talafant (E.). — Properties and composition of the bile pigment giving a direct diazo-reaction, Nature, 1956, **178**, 312.

143. Talafant (E.) et Appelt (J.). — Casopis Lekaru Ceskych, 1966, **105**, 806.

144. Talafant (E.). — Nature, 1957, **180**, 1050.

145. Talafant (E.). — On the nature of direct and indirect bilirubin V. The presence of glucuronic acid in the direct bile pigment, Chem. Listy, 1956, **50**, 817.

146. Tenhuenn (R.). — Acta Chem. Scand., 1963, **17**, 2127.

147. Thompson (R.P.H.). — Modification of Michäelsson's method for the measurement of plasma total bilirubin, J. Clin. Pathol., 1969, **22**, 439-441.

148. Tygstrup (N.) et Brodersen (R.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, **21**, 62.

149. Van den Bergh (A.A.H.) et Müller (P.). — Veber eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin, Biochem. Z., 1916, **77**, 90.

150. Varela-Fuentes (B.) et Viana (C.). — Compt. Rend. Soc. Biol., 1935, **118**, 1518.

151. Varela-Fuentes (B.) et Viana (C.). — De la nature de la bilirubine éthéro-extractible de quelques sérums ictériques, Compt. Rend. Soc. Biol., 1933, **114**, 789.

152. Verschure (J.C.M.) et Mejnlieff (P.F.). — Clin. Chim. Acta, 1956, **1**, 154.

153. Vychub (A.I.). — En russe : Sur le dosage photométrique des fractions de la bilirubine d'après Jendrassik, Kleggorn et Graf, Lab. Delo SSSR, 1968, **12**, 747-748.

154. Watson (C.J.). — The importance of the fractional serum bilirubin determination in clinical medicine, Ann. Intern. Med., 1956, **45**, 351.

155. Watson (C.J.), Campbell (M.) et Lowry (P.T.). — Proc. Soc. Exptl. Biol., 1958, **98**, 707.

156. Weber (A.P.), Schalm (L.) et Witmans (J.). — Bilirubin monoglucuronide (Pigment I). A complex, Acta Med. Scand., 1963, **173**, 19-24.

157. Weber (A.P.), Schalm (L.) et Ruben (A.T.). — Evidente against bilirubin sulfate, Acta Med. Scand., 1965, **177**, 519.

158. Weber (A.P.) et Schalm (L.). — Quantitative separation and determination of bilirubin and conjugated bilirubin in human serum, Clin. Chim. Acta, 1962, **7**, 805.

159. White (D.), Haidar (G.A.) et Reinhold (J.G.). — Spectrophotometric measurement of bilirubin concentrations in the serum of the newborn by the use of a microcapillary method, Clin. Chem., 1958, **4**, 189.

160. With (T.K.). — Bilirubin and urobilirubinoïd contents of human bile, Acta Med. Scand., 1942, **122**, 513-528.

161. With (T.K.). — Bile pigments, Academic Press, New York, 1968.

162. With (T.K.). — Ueber die sogenannte direkte Diazoreaktion des Serumbilirubins (v. d. Bergh) und ihre quantitative Messung, Z. Physiol. Chem., 1943, **278**, 130.

163. Zaroda (R.A.). — A simplified procedure for the determination of total bile pigments in jaundiced serum, Amer. J. Clin. Pathol., 1966, **45**, 70-74.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 15

I. — METHODES UTILISEES POUR LA SEPARATION ET LA DETERMINATION DES PIGMENTS BILIAIRES 19

A. — Principes 23

I. — *Séparation par chromatographie* 23

1. Chromatographie en phase inversée. 23

2. Chromatographie par échange d'ions. 25

3. Filtration par gel des conjugués de la bilirubine 26

4. Chromatographie sur papier 26

5. Chromatographie sur couche mince des azo-dérivés 27

II. — *Séparation par solvants non miscibles.* 29

1. Bilirubine, mésobilirubine et conjugués 29

2. Azo-dérivés 30

III. — *Spectrophotométrie* 33

1. Bilirubine, mésobilirubine et conjugués 33

2. Diazotation et spectrophotométrie des azo-dérivés 35

3. Oxydation par le chlorure ferrique et spectrophotométrie 38

Détermination fluorimétrique de la bilirubine 39

B. — Applications 41

I. — *Solutions et préparations standard* 41

1. Bilirubine et mésobilirubine 41
2. Bilirubine diglycuronide 42

II. — *Procédés* 45

1. Bilirubine totale par diazotation 45
2. Bilirubine non conjuguée à l'albumine en présence d'oxyhémoglobine par spectrophotométrie directe 46
3. Bilirubine non conjuguée par spectroprotéines par l'acétone 47
4. Bilirubine libre et bilirubine conjuguée par extraction et diazotation . . 47
5. Bilirubine libre et bilirubine conjuguée par extraction et oxydation . . 49
6. Bilirubine libre (et mésobilirubine) par extraction par le chloroforme . . 50
7. Réaction directe et bilirubine totale par diazotation 52
8. Bilirubine diglycuronide par la méthode de dérivation des isotopes 53
9. Division par solvants et mesure de la bilirubine libre, de la bilirubine monoglycuronide et de la bilirubine diglycuronide 57

II. — DOSAGE DES FRACTIONS DE LA BILIRUBINE PLASMATIQUE CHEZ LE CHEVAL 61

CONCLUSION 69

BIBLIOGRAPHIE 73